



Schlussbericht zum Thema

**Kleistogamer Hafer zur
nachhaltigen Vermeidung von
Flugbrand**

FKZ: 2815NA107; 2815NA172

**Projektnehmer: Julius Kühn-
Institut Bundesforschungsinstitut für
Kulturpflanzen (JKI); Landbauschule
Dottenfelderhof e.V.**

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung
und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des
Deutschen Bundestages im Rahmen des
Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere
Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische und nachhaltige Land- und Lebensmittelwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖLN-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in Bonn in die Praxis umgesetzt. Das Programm untergliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder, den Forschungs- und den Informationsbereich.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter
www.bundesprogramm.de

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel: 0228-6845-3280
E-Mail: boeln@ble.de

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

BÖLN

Bundesprogramm Ökologischer Landbau
und andere Formen nachhaltiger
Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Gemeinsamer Schlussbericht

Titel des Forschungsvorhabens

Kleistogamer Hafer zur nachhaltigen Vermeidung von Flugbrand (KLAR)

Autoren: M. Herrmann, B. Schmehe, S. Brodführer

1. Zuwendungsempfänger: Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an
landwirtschaftlichen Kulturen; Dr. Matthias Herrmann

FKZ: 2815NA107

2. Zuwendungsempfänger: Landbauschule Dottenfelderhof e.V.

Dr. Ben Schmehe

FKZ: 2815NA172

Laufzeit: 01.03.2017 bis 29.02.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einführung	4
Gegenstand des Vorhabens.....	4
Ziele und Aufgabenstellung.....	4
Planung und Ablauf des Projektes.....	4
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	5
Blühvorgang und Kleistogamie bei Hafer	5
Biologie von Haferflugbrand (<i>Ustilago avenae</i>).....	5
Flugbrandresistenz und Resistenzgenetik.....	6
Kleistogamie als Pseudoresistenz.....	7
Assoziationsanalysen bei Hafer	7
3. Material und Methoden	7
Phänotypisierung.....	7
Filterung der Markerdaten.....	9
Struktur- und Assoziationsanalyse	10
4. Ergebnisse	10
AP 1: Phänotypisierung der Blühmerkmale und des Flugbrandbefalls	10
Morphologische Ursachen für kleistogames Blühen.....	13
AP 2: Assoziation molekularer Marker mit Blühmerkmalen und Flugbrandresistenz	15
Strukturanalyse	15
Assoziationsanalyse.....	17
AP 3: Nutzung von Kleistogamie für eine Verminderung der Flugbrandinfektion.....	19
5. Diskussion der Ergebnisse	22
AP1 Phänotypisierung der Blühmerkmale und Flugbrandresistenz.....	22
AP2 Assoziationsanalyse	23
AP3 Pseudoresistenz: Nutzung von Kleistogamie für eine Verminderung der Flugbrandinfektion .	24
6. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	25
7. Gegenüberstellung der geplanten und erreichten Ziele	26
8. Zusammenfassung	26
9. Literaturverzeichnis	27
10. Übersicht zu Veröffentlichungen und Verbreitung der Ergebnisse	31

Abkürzungsverzeichnis

AE	Antherenextrusion (Bonitur der Stärke des Herausschiebens der Antheren zur Blüte)
AIC	Akaike-Informationskriterium
AR	Antherenretention (Anzahl Antheren je Blüte, die nach dem Blühen in der Blüte verblieben sind)
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
bcOFL	Box-Cox-transformierte Werte der Offenblütigkeitsbonitur
CDC	Crop Development Centre (University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Kanada)
cM	Centimorgans
CV	Variationskoeffizient
DF	Degrees of freedom
DNA	Deoxyribonucleic acid
GBS	Genotyping-by-Sequencing
GWAS	Genomweite Assoziationsanalyse
GLM	Verallgemeinertes Lineares Modell
GLM+PCA	Verallgemeinertes Lineares Modell plus Hauptkomponentenanalyse
GxE	Genotype-by-environment interaction
LBS	Landbauschule Dottenfelder Hof e.V., Bad Vilbel
LG	Linkage group
IgAR	logit-transformierte Werte der Antherenretention
IgUA	logit-transformierte Prozentwerte zur <i>Ustilago avenae</i> Infektion
LOD	Logarithm (base 10) of odds
MAS	Marker-assisted selection
MLM+K	Gemischtes Lineares Modell plus Kinshipmatrix
MTA	Marker-trait association (Marker-Merkmal-Assoziation)
OFL	Open flowering, (Offenblütigkeitsbonitur)
QTL	Quantitative trait locus
PCA	Hauptkomponentenanalyse
RIL	Recombinant inbred line
SE	Standard error
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSRs	Simple sequence repeats
SUSC	Susceptibility oder Niveau der Anfälligkeit, in Prozent brandiger Rispen
TGW	Thousand grain weight
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UA	Befall mit <i>Ustilago avenae</i> in Prozent befallene Rispen
UA1	Flugbrandinfektion in Relation zur Gesamtrispenzahl im ersten Jahr der Resistenzprüfung

1. Einführung

Gegenstand des Vorhabens

Das Projekt zielte auf die Förderung der ökologischen Haferzüchtung ab und hierbei insbesondere auf die Erforschung der Resistenz gegen Haferflugbrand (*Ustilago avenae* (Pers.) Jens.) und des Niveaus der Kleistogamie als Alternative oder Ergänzung zur Resistenz. Diese Merkmale wurden an einem Hafersortiment von 540 Sorten, Zuchtstämmen und Genbankakzessionen erfasst, welches zudem genotypisiert wurde, um über eine genomweite Assoziationsanalyse Informationen zur Genetik der Zielmerkmale zu generieren. Der natürliche Infektionsweg von Flugbrand verläuft über die geöffnete Blüte. Im Projekt wurde daher die Idee verfolgt, kleistogamen Hafer (*Avena sativa* L.) zu identifizieren, der durch geschlossenes Blühen die Infektionskette unterbricht und ggf. zur Vermeidung der Flugbrandinfektion genutzt werden kann. Das Projekt hatte somit den Saathafer, sein Blühverhalten, die Flugbrandresistenz und Marker-Merkmal-Assoziationen zum Gegenstand.

Ziele und Aufgabenstellung

Das Vorhaben hatte zum Ziel, das Risiko von Flugbrandinfektionen im ökologischen Pflanzenbau und in der ökologischen Saatgutproduktion zu reduzieren, wo der wirtschaftliche Schaden immens sein kann, wenn zu viele Brandrispen im Bestand gefunden werden. Hierzu sollte untersucht werden, inwieweit das geschlossene Blühen (Kleistogamie) beim Hafer eine Infektion der Samenanlage mit Flugbrand reduziert. Analoge Arbeiten bei der Sommergerste weisen auf einen engen Zusammenhang des Grades an Kleistogamie und der Anfälligkeit gegenüber Flugbrand hin. Die Vorteile dieser Pseudoresistenz (Petersen 1960) lägen im geringeren Prüfaufwand und in der Rassenunabhängigkeit der Befallsminderung. Die genetische Architektur einer durch Kleistogamie erzielten Flugbrandabwehr beim Hafer sollte mit einer genomweiten Assoziationsanalyse aufgeklärt werden. Hierzu wurde ein Sortiment historischer und moderner Hafersorten und Zuchtstämmen hinsichtlich ihrer Flugbrandanfälligkeit und Blühmerkmale sowie auf molekularer Markerebene charakterisiert.

Planung und Ablauf des Projektes

Das Projekt verlief im Wesentlichen wie geplant. Eine Änderung bestand in der Hinzunahme des zweiten Sortimentes, die eine Verdopplung des Arbeitsaufwandes bedeutete, der personell nicht gedeckt war, weshalb die Anzahl der Prüfumwelten für das erste Sortiment reduziert wurde.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Blühvorgang und Kleistogamie bei Hafer

Kenntnisse zum Blühverhalten sind für die Züchtungsmethodik von elementarer Bedeutung, weshalb erste grundlegende Untersuchungen zur Blütenbiologie von Hafer bereits Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts erfolgten (Zade 1918). In diesen Studien ging es um die Aufklärung des Blühvorgangs sowie der Anteile an Selbst- bzw. Fremdbefruchtung. Der Blühvorgang wird von Zade (1918) für damalige *A.-sativa*-Sorten detailliert beschrieben. Demnach beginnt die tägliche Blühphase nachmittags gegen 14 Uhr (Winterzeit). Bei Tagestemperaturen unter 17 °C oder Trockenheit setzt das Blühen später ein und fällt weniger offen aus (Zade 1918). Beim offenen Blühen werden Deck- und Vorspelze durch anschwellende Lodiculae auseinandergedrückt, so dass die Narbe sichtbar wird. Gleichzeitig werden die Antheren durch zügiges Längenwachstum der Filamente herausgeschoben. Da es eine zeitliche Staffelung der Organentwicklung innerhalb der Pflanze und Rispe gibt, dauert die Blühphase einer Pflanze etwa 7 bis 14 Tage (Nicolaisen 1950). Offenblütigkeit führt zum Herausschieben der Antheren aus der Blüte, der sogenannten Antherenextrusion (AE). Misono (1936) und Nishiyama (1970) beschreiben die Abhängigkeit des Blühvorgangs bei verschiedenen *Avena* ssp. von der Tageszeit, Luftfeuchte, Temperatur, Sonnenscheindauer, Wind und Regen. Weitere Beobachtungen resultieren aus Experimenten zur Optimierung der Kreuzungsmethodik (Coffman 1937, Brown and Shands 1956, Marshall 1962), Auskreuzungsstudien (Stanton and Coffman 1924, Garber and Quisenberry 1927, Griffie and Hayes 1925, Fatunla and Frey 1980) und Grundlagenforschung zur Entwicklungsbiologie der Blüte (Bonnett 1961).

Biologie von Haferflugbrand (*Ustilago avenae*)

Charakteristisch für *U. avenae* sind die kugeligen, mit kleinen Warzen besetzten Brandsporen, die eine Abgrenzung von anderen *Ustilago*-Arten ermöglichen. Haferflugbrandsporen, die vom Wind auf die Fruchtanlagen blühender Nachbarpflanzen geweht werden, keimen größtenteils dort aus und überwintern als Ruhemyzel zwischen Korn und Spelze (Mills 1966, Thiede 1963, Zade 1924, Kolk 1930). Dieses Ruhemyzel sowie nicht gekeimte Sporen bilden den Ausgangspunkt für die Keimlingsinfektion nach der Aussaat. Bei der Inokulation im Rahmen der Resistenzzüchtung werden Sporen in die Zwischenräume zwischen Kern und Spelze per Vakuum gebracht (Zade 1928) und führen so zu hohen Infektionsraten bei anfälligem Hafer. Wenn man eine Infektion auf natürliche Weise durch gemeinsames Abblühen brandiger Rispen mit den zu infizierenden erreichen möchte, ist der Infektionserfolg sehr unsicher und von der Witterung während der Blüte abhängig (Moldenhauer 1927). Bei der natürlichen Infektion müssen Sporen entweder direkt in die Samenanlage gelangen oder auf den Innenseiten der Deck- oder Vorspelze haftenbleiben. Beides setzt ein offenes Blühen voraus, da die genannten Organe bei geschlossener Blüte von Hüllspelzen eingeschlossen werden. Die Hüllspelzen gehen beim Dreschen verloren. Die Keimlingsinfektion durch außen an der Spelze

haftende Sporen ist praktisch bedeutungslos für die Infektion (Zade 1924) – nur bei entspelzten nackten Karyopsen kommt es zur Keimlingsinfektion, wenn Sporen außen anhaften.

Keimt infiziertes Saatgut aus, werden durch Wachstum der Hyphen die Blatt- und Halmbasis sowie die meristematischen Gewebe befallen. Mills (1966) berichtet über einen sehr zeitigen Befall der Rispenanlage. So wurde bereits in unausgebildeten Rispenanlagen von 1,5 cm Länge eine Sporenbildung durch den Pilz beobachtet. Die im Vergleich zu gesunden Rispen oft leicht verzögert geschobenen Brandrispen sorgen über den gesamten Blühzeitraum hinweg für ein natürliches Inokulum.

Von Nicolaisen (1934) wird der Generationswechsel von *U. avenae* zusammengefasst beschrieben. Demnach keimt die reife einkernige Chlamydospore zu einem vierkammerigen Promyzel aus. Jeder dieser Teile kann sich durch Sporidienabschnürung oder durch Myzelwachstum vermehren. Myzel oder Sporidien verschiedener Abschnitte können miteinander kopulieren, wenn sie geschlechtlich verschieden sind. Einzig aus den kopulierten Zellen entsteht ein Myzel, welches in der Lage ist, in die Pflanze einzudringen und wiederum Chlamydosporen entstehen zu lassen. Durch diesen mehrfach nachgewiesenen Generationswechsel sind die Chlamydosporen oft heterozygot und bei der Isolation von Einzelsporen können unterschiedlich virulente Linien herauspalten (Sampson und Western 1938). Deshalb ist die Isolation und Vermehrung von haploiden Sporidien der sicherste Weg, um reine Flugbrandlinien zu erhalten. Ein weiterer Weg zur Erzeugung homozygoter Rassen wird in der wiederholten Vermehrung auf rassenspezifisch resistenten Hafersorten gesehen (Sampson und Western 1938).

Von *U. avenae* werden zahlreiche Pathotypen gebildet, deren Differenzierung mit Hilfe eines internationalen Testsortimentes möglich ist. Letzteres besteht aus 23 kanadischen Haferlinien und 2 alten deutschen Sorten, deren rassenspezifische Resistenz bereits von Nicolaisen (1934) beschrieben ist. Eigene Versuche hiermit im Rahmen der beiden abgeschlossenen Projekte (02OE030, 03OE647) zeigten Unterschiede im Virulenzspektrum bei den deutschen Flugbrandherkünften und der finnischen Rasse sowie eine geringere Virulenz im Vergleich zu einer Kanadischen Flugbrandrasse auf.

Flugbrandresistenz und Resistenzgenetik

Zur Resistenz gegen Haferflugbrand gibt es eine Reihe von Arbeiten aus Nordamerika (Reed et al. 1925, Reed et al. 1947; Nielsen 1977, Wilcoxson und Stuthman 1993), Deutschland (Nicolaisen 1934, Schattenberg 1934), Frankreich (Moule 1957), Polen (Miczynski 1955) und der ehemaligen Tschechoslowakei (Bartoš 1964), in denen zahlreiche Resistenzquellen beschrieben sind. Nicolaisen (1934) fand im deutschen Hafersortiment jedoch keine Resistenz, die wirksam gegen alle in Deutschland gesammelten Rassen war. Lediglich einige ausländische Hafersorten erwiesen sich als immun im Sinne einer vollständigen Befallsfreiheit. Als Resistenzmechanismen wurden (i) eine Eindringungsresistenz in die Epidermis, (ii) eine Hypersensitivitätsreaktion nach dem Eindringen und (iii) die Hemmung des Myzelwachstums im Gewebe beschrieben (Western 1936). Zur Vererbung von

Flugbrand-Resistenzen gibt es zahlreiche Publikationen (Nicolaisen 1931 und 1934, Reed und Stanton 1938, Kibite et al. 2000), die übereinstimmend eine Dominanz für Resistenz konstatieren und dabei je nach Resistenzquelle und Virulenz des Pathogens ein, zwei oder drei unabhängige Genorte postulieren.

Kleistogamie als Pseudoresistenz

Offene Blüten werden von zahlreichen Pathogenen zur Infektion genutzt. Neben *Ustilago* ssp. sind es *Pyrenophora* ssp., *Claviceps purpurea* und *Fusarium* ssp., deren Generationszyklus mit der Infektion der Samenanlage durch offenes Blühen ermöglicht oder gefördert wird. Ergebnisse am Wirt/Pathogen-System Gerste/Flugbrand (Pedersen 1960) zeigen, dass die Nutzung der Kleistogamie züchterisch effektiver als die Resistenzzüchtung über Infektionstests sein kann. Pedersen (1960) empfiehlt bei zweizeiliger Gerste die Erfassung der Antherenextrusion als gut erfassbares Merkmal, welches mit der Offenblütigkeit korreliert. Bei Weizen wird der Kleistogamie-Ansatz als eine Möglichkeit zur Reduktion der Fusarienmykotoxin-Akkumulation diskutiert (Buerstmayr und Buerstmayr 2015, Kubo et al. 2013) und in der jüngsten Studie von Tang et al. (2020) bestätigt. Jüngste eigene Untersuchungen zum Blühverhalten bei Hafer zeigen, dass es signifikante quantitative Unterschiede in der Offenblütigkeit gibt und wenige Hafersorten vollständig kleistogam sind (Herrmann et al. 2020). Ähnlich wie bei Weizen zeigt sich auch bei Hafer eine negative Korrelation zwischen Antherenextrusion und Fusariuminfektion oder DON-Gehalt, die darauf basiert, dass Pollen und Antherenreste ein guter Nährboden für *Fusarium* sind (Tekle et al. 2012 und 2020). Wenn Antheren für den Pilz nicht verfügbar sind, sei es durch Kleistogamie oder starke Antherenextrusion, verläuft die Infektion langsamer und schwächer.

Assoziationsanalysen bei Hafer

Marker-Merkmal-Assoziationen setzen eine hohe Markerabdeckung der untersuchten Population voraus, was bei Hafer mit der Nutzung der AFLPs und DArTs zunehmend gegeben war und mittlerweile durch die neuesten Genotypisierungsplattformen gewährleistet ist (Oliver et al. 2011, Oliver et al. 2013; Chaffin et al. 2016). Vor und während des Projektes wurden mehrere Assoziationsstudien für Hafer publiziert (Foresman et al. 2016, Klos et al., 2016, Klos et al. 2017), in denen zunächst Merkmale wie das Rispenstehen und die Kronenrostresistenz untersucht oder ältere Evaluierungsdaten (Winkler et al. 2016) genutzt wurden.

3. Material und Methoden

Phänotypisierung

Das Projekt startete wie geplant 2017 mit der Prüfung eines Sortimentes von 270 Hafersorten bzw. Zuchtstämmen, die an den drei Standorten Groß Lüsewitz (GLÜ), Quedlinburg (QLB) und Landbauschule Dottenfelder Hof (LBS) in Bad Vilbel geprüft wurden. Die Inokulation des Saatgutes erfolgte mit der Vakuummethode und 1g Flugbrandsporen je Liter Suspension durch den

Projektpartner Dr. Ben Schmehe (LBS). Im Jahre 2018 wurde mit Zustimmung durch den Projektträger das Prüfsortiment KLAR1 durch ein weiteres Sortiment KLAR2 erweitert und somit der Prüfungsumfang kostenneutral verdoppelt. Um die Prüfungen mit dem verfügbaren Personal bewältigen zu können, wurde KLAR1 im Versuchsjahr 2018 nur an zwei anstatt drei Standorten (GLÜ und QLB) und KLAR2 an zwei Standorten (LBS und GLÜ) angebaut. Die beiden Sortimente KLAR1 und KLAR2 wurden jeweils getrennt als 18x15-Rechteckgitter an den Standorten (Tabelle 1) gedrillt. Eine Parzelle bestand aus einer Doppelreihe von 90 cm Länge und einem Reihenabstand von 20 cm, bei ca. 40 Korn pro Reihe.

Erfasst wurden das BBCH-Stadium zum Rispenstadium, die Wuchshöhe in cm, den Grad der Offenblütigkeit (OFL; Bonitur 1 bis 9), die Antherenextrusion (AE; Bonitur 1 bis 9), der prozentuale Anteil brandiger Rispen an der Gesamtrispenanzahl je Parzelle (UA; Auszählung der Rispen), Antherenretention (AR; Auszählung der Antheren (0-1) bei jeweils 8 zum Blühzeitpunkt geernteten Rispen pro Parzelle). Die Rispenproben wurden dazu eingefroren und in den Wintermonaten ausgezählt. Dieser Ansatz beruht auf der Annahme, dass weder die AR noch die OFL allein betrachtet das Niveau der Kleistogamie ausreichend präzise abbilden. Deshalb wurde anhand der AR und der OFL ein Kleistogamieindex (KLI) nach folgender Formel berechnet:

$$KLI = 9 + 3 \cdot AR - 0.5 \cdot OFL \quad (1)$$

Die stärkere Wichtung der AR berücksichtigt deren höhere Präzision und Heritabilität; zudem wird der Unsicherheit der OFL-Bonitur Rechnung getragen. Durch die Addition von 9 ergeben sich grundsätzlich positive Werte für den KLI, was für die weitere Transformation und Darstellung vorteilhaft ist.

Im Merkmal Antherenextrusion müssen wir konstatieren, dass eine Bonitur als eher unsicher einzustufen ist, sich nicht in jeder Prüfung eine Differenzierung ergibt und die Heritabilität sehr niedrig ist (39 % in KLAR1). Auf eine Darstellung und Besprechung der Ergebnisse wird daher im Folgenden verzichtet.

Zur statistischen Analyse der Ergebnisse wurden die Daten transformiert (Box-Cox-Transformation bei Bonituren, Logit-Transformation der Prozentdaten), auf Ausreißer geprüft und überarbeitet, die Wirksamkeit der Transformation geprüft (BASIC in PLABSTAT) und ANOVAs der Serien in PLABSTAT inklusive der Heritabilitäten berechnet.

Tabelle 1: Übersicht der Merkmalerfassung für KLAR1 und KLAR2 in den drei Anbaujahren, drei Umwelten für die untersuchten Merkmale (UA = prozentuale Befallsstärke nach Inokulation des Saatguts mit Sporensuspension; OFL = Bonitur des Öffnungsgrades der Blüten im Feld; AR = Auszählung der Antheren-Retention; UA_N = Befallsstärke der Nachkommen nach natürlicher Blüteninfektion im Feldversuch; PH = Wuchshöhe (Plant height), f = fehlende Daten).

Jahr	Ort	KLAR1	KLAR2	Nachbau im Gewächshaus	Nachbau im Feldversuch
2017	LBS	UA, OFL, AR, BBCH, PH			
	GLÜ	UA, OFL, AR, BBCH, PH			
	QLB	UA, OFL, AR, BBCH, PH			
2018	LBS		UA, OFL, AR, BBCH, PH	UA _N KLAR1	
	GLÜ	UA, OFL, AR, BBCH, PH	UA, OFL, AR, BBCH, PH	UA _N KLAR1	UA _N KLAR1
	QLB	UA, OFL, AR, BBCH, PH		UA _N KLAR1	UA _N KLAR1
2019	LBS		UA, OFL, AR, BBCH, PH		
	GLÜ		f	UA _N KLAR1	f
	QLB		UA, OFL, AR, BBCH, PH	UA _N KLAR1	

Filterung der Markerdaten

Die DNA-Isolation aus frischem Blattmaterial der Prüfglieder des KLAR-Sortiments erfolgte am JKI nach der CTAB-Methode (Stein et al. 2001). Das anschließende Genotyping-by-Sequencing (GBS) wurde durch Laval University (Library construction) und Genome Canada (Sequenzierung) durchgeführt. Die erste bioinformatische Datenaufbereitung wurde von Dr. N. Tinker in Kanada ausgeführt. Der daraus entwickelte Datensatz mit 240.958 GBS-SNPs wurde gefiltert (Completeness > 80% = 427 UAN KLAR1n 534; MAF 0.0001 gleich >0.01%), woraus sich ein Datensatz mit 33.196 GBS-SNP ergab. Mit diesem Datensatz wurden genetisch identische Prüfglieder im Sortiment anhand der genetischen Distanz identifiziert. Anhand der Distanzmaße von fünf wesentlich im Sortiment doppelt vertretenen Sorten war es möglich, einen minimalen Distanzwert für die Einstufung als genetische 'Klongruppe' zu definieren. Eine genetische Distanz von maximal 0.006 diente als Grenzwert zur Festlegung, welche Genotypen identisch sind. Insgesamt konnten in beiden KLAR-Sortimenten 29 Gruppen identischer Genotypen identifiziert werden. Zur Festlegung, welche der genetischen Klone für die weitere Assoziationsberechnung verwendet werden, wurden die Phänotypdaten UA, OFL, AR, PH und BBCH der Klone herangezogen. Bei gleicher Phänotypausprägung der genetischen Klone wurde derjenige mit den geringeren Fehlern und/oder der geringeren Streuung im Datensatz belassen.

Der Datensatz mit den 33.196 GBS-SNPs wurde in TASSEL weiter gefiltert (Parameter: proportion of sites present 0.08), wodurch sich ein Datensatz mit 12.224 GBS-SNPs ergab. Darüber hinaus wurden Marker ohne Zuordnung zur Konsensuskarte sowie Hafergenotypen mit über 9 % Fehlern entfernt. Daraus entstand ein Datensatz mit 2399 GBS-SNPs, der für Assoziationsanalysen genutzt wurde.

Struktur- und Assoziationsanalyse

Für die Berechnung der Cluster-Anzahl und der Q-Matrix in STRUCTURE wird die Verwendung von nur schwach gekoppelten Markern empfohlen (Pritchard et al. 2000). Deshalb wurden Marker mit weniger als 2 cM Abstand vereinzelt und dabei jene entfernt, die die größere Anzahl Fehldaten hatten. Die so entstandene Matrix von 451 Genotypen x 955 GBS-SNP wurde für einen ersten STRUCTURE-Lauf mit den Parametern 5000 Burn-in period und 50000 Reps genutzt.

Die Struktur des Sortiments wurde anhand von Hauptkomponentenanalyse, Dendrogrammen, genetischer Distanzmatrix (via TASSEL und R-Package ggplot2), und Clusterzuordnung (via STRUCTURE) untersucht. Aufgrund der festgestellten moderaten Struktur des Gesamtsortimentes wurden für die Assoziationsberechnungen die Modellvarianten GLM+PCA sowie MLM+PCA+Kinshipmatrix in TASSEL für das KLAR1- und das KLAR2-Sortiment genutzt. Die Assoziationen wurden mit den Mittelwerten der transformierten Daten für jedes Sortiment (KLAR1 und KLAR2) gesondert berechnet, weil die beiden Sortimente außer 2018 in Groß Lüsewitz unter verschiedenen Umwelten geprüft wurden. Die Prüfung der Signifikanz der einzelnen Marker-Merkmal-Assoziationen erfolgte nach Benjamini und Hochberg (1995).

4. Ergebnisse

AP 1: Phänotypisierung der Blühmerkmale und des Flugbrandbefalls

Der Witterungsverlauf in den drei Vegetationsperioden war äußerst unterschiedlich und beeinflusste den Flugbrandbefall und die Ausprägung der anderen Merkmale stark. Für den Flugbrandbefall ist eine geringe Bodenfeuchte während und nach der Aussaat sehr förderlich, weshalb die Flugbrandbefallswerte im Dürrejahr 2018 extrem hoch waren und in den übrigen Jahren eher mittel bis gering. In Tabelle 2 sind neben den Gesamtmittelwerten für jede Umwelt auch die Niederschlagssummen zur Zeit der Aussaat sowie die Temperatur in dieser Zeit aufgeführt.

Die Serienverrechnung der Sortimente ergab eine sehr hohe Heritabilität für den Befall mit Flugbrand (UA) in KLAR1, eine niedrige Heritabilität dagegen in KLAR2. Letzteres wird vor allem mit der geringen Differenzierung für Flugbrandbefall im Anbaujahr 2019 zusammenhängen, in dem viele anfällige Prüfglieder ohne Befall vorgefunden wurden (Tab. 2), aber auch mit der geringeren Umweltanzahl. Die Heritabilitäten bei BBCH und PH sind nicht so hoch wie erwartet, was mit der Beeinflussung dieser Merkmale durch starken Flugbrandbefall 2018 zusammenhängen könnte.

Das Niveau der Offenblütigkeit wurde durch die Witterung während der Blüte beeinflusst. So war die Offenblütigkeit 2018 in Groß Lüsewitz durch anhaltende Trockenheit reduziert, was sich auch in einer höheren Antherenretention widerspiegelt (Tab. 2).

Tab. 2 Mittelwerte und Heritabilitäten in beiden Sortimenten für die Merkmale Flugbrandresistenz (UA), Offenblütigkeit (OFL), Antherenretention (AR), Kleistogamieindex (KLI), Wuchshöhe (PH) und

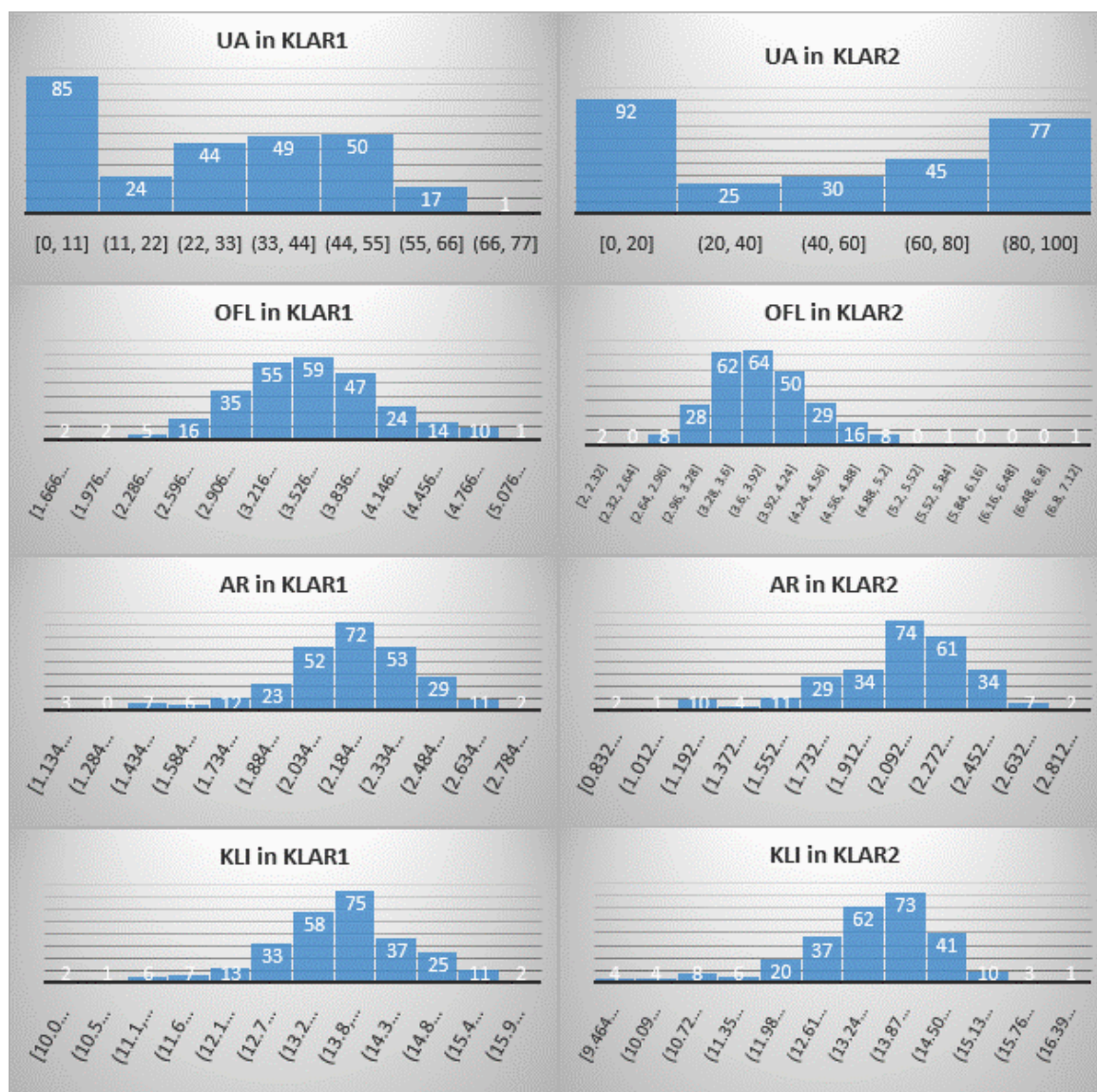
BBCH in den jeweiligen Prüfumwelten mit der Niederschlagssumme (NDS) und Temperaturmittelwert (Temp.) vom Zeitraum 7 Tage vor der Aussaat bis 14 Tage nach der Aussaat

	NDS	Temp.	UA	OFL	AR	KLI	PH	BBCH
KLAR1								
LBS17	71.9	8.5	19.1	3.5	2.3	14.1	60.7	54.8
GLU17	36.1	6.2	15.9	3.0	2.0	13.5	107.1	51.4
GLU18	27.7	11.2	38.0	2.2	2.6	15.6	62.3	57.3
QLB17	26.4	7.7	24.5	4.7	2.2	13.1	101.8	53.8
QLB18	28.8	13.5	36.8	4.7	2.1	12.9	81.8	56.3
Gesamtmittel			27.1	3.7	2.2	13.8	82.9	54.7
Heritabilität			97.3	63.0	86.4	86.5	87.6	87.0
KLAR2								
LBS18	40.3	14.8	12.2	3.5	2.0	13.2	88.3	48.7
LBS19	16.2	11.7	0.6	4.0	2.3	13.8	96.8	61.1
GLU18	27.7	11.2	46.6	3.9	2.3	13.9	61.4	54.7
QLB19	39.2	8.8	0.9	3.2	2.1	13.4	112.4	54.0
Gesamtmittel			15.2	3.7	2.1	13.6	90.9	54.6
Heritabilität			66.7	42.0	84.9	84.7	88.0	92.3

Die Offenblütigkeit wird besonders durch den täglichen Temperaturverlauf beeinflusst. Aufgrund der Abhängigkeit des zeitlichen Ablaufs (14 bis 20 Uhr) der Blüte vom Witterungsverlauf ist die Wahl des richtigen Boniturzeitpunktes mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Unter Berücksichtigung dieser Einflussfaktoren sind die gefundenen Heritabilitäten von 63% für KLAR1 und 42% für KLAR2 vergleichsweise hoch.

Deutlich höhere Heritabilitäten weisen die Merkmale AR und KLI auf. Wie die Histogramme für die untersuchten Sortimente (Abb. 1) veranschaulichen, sind OFL, AR und KLI als quantitative Merkmale zu betrachten.

Abb. 1: Histogramme für UA, OFL, AR und KLI der beiden Sortimente KLAR1 und KLAR2 auf Basis der Mittelwerte über alle Umwelten



Die für den Flugbranderreger günstigen Bedingungen im Versuchsjahr 2018 an allen drei Standorten ermöglichen eine maximale Differenzierung der Sorten für Flugbrandresistenz. Über beide Sortimente betrachtet wurden 139 Prüfglieder der hochresistenten Gruppe (0 bis 5 % Flugbrand), 28 der mittelresistenten Gruppe und 375 den mittel- bis stark anfälligen Gruppen zugeordnet.

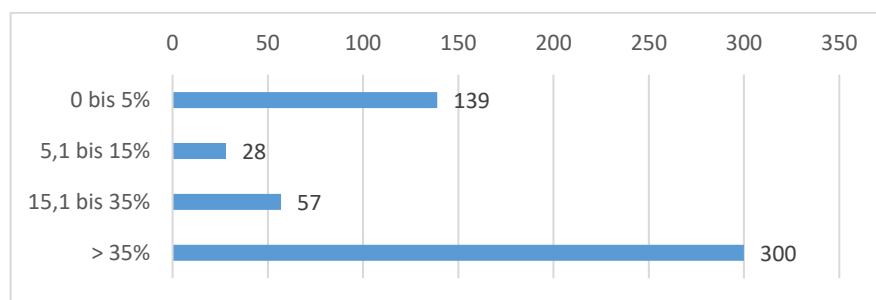


Abb. 2: Anzahl Haferlinien in den 4 Infektionsstärkegruppen über beide KLAR-Sortimente

Die meisten resistenten Prüfglieder stammen vom Projektpartner LBS, wo seit Jahren systematisch auf Resistenz selektiert wird. Eine ausgeprägte Resistenz gegen die eingesetzte Flugbrandrasse zeigten auch einige Zuchtstämme der Nordsaat, von Danko und der bayerischen LfL, obwohl in den dortigen Zuchtprogrammen die Flugbrandresistenz nicht geprüft wird.

Im Sortiment KLAR1 wurden 12 und in KLAR2 drei stark kleistogame Prüfglieder ($KLI \geq 15.5$) identifiziert. Die überwiegende Mehrzahl der Hafersorten ist somit offenblütig bei variierender Anzahl kleistogamer Blüten. Zu den Ursachen der Kleistogamie wurden erste Untersuchungen vorgenommen, die auf Studien bei Gerste und Reis aufbauen.

Morphologische Ursachen für kleistogames Blüten

Aus Studien bei Gerste und Reis sind verschiedene Ursachen für kleistogames Blüten, wie z. B. zusammengewachsene Hüllspelzen oder nicht funktionstüchtige Lodicali bekannt. Welche Ursachen dem kleistogamen Blüten bei Hafer zugrunde liegen, wurde im Rahmen des Projektes erstmalig untersucht.

Dabei wurde als eine mögliche morphologische Ursache vermutet, dass die Deckspelzen das Blütchen so stark umschließen, dass das Öffnen der Blüte verhindert wird. Diese morphologische Besonderheit liegt bei der Sorte ‚Aveia‘ vor, die in allen Bonituren als vollständig kleistogam eingestuft wurde. In Abb. 3 ist eine präparierte Blüte der Sorte ‚Aveia‘ im Vergleich zu zwei Blüten von zwei verschiedenen offenblütigen Prüfgliedern dargestellt. Bei den offenblütigen Prüfgliedern ist zu erkennen, dass sich die beiden Seitenränder der Deckspelze in der Blütenmitte nicht überlappen. Vor- und Deckspelze lassen sich somit ohne großen Reibungswiderstand beim Öffnen der Blüte spreizen. Die überlappenden und eingewölbten Seitenränder der Deckspelzen bei ‚Aveia‘ (Abb. 3c) erfordern dagegen eine stärkere Kraft, um Vorspelze und Deckspelze bei der Blüte zu spreizen. Vermutlich ist die Hebelkraft der Lodicali bei ‚Aveia‘ nicht ausreichend groß und die Sorte blüht geschlossen ab. Neben ‚Aveia‘ wurde dieser besondere Spelzenphänotyp noch bei zwei weiteren Prüfgliedern allerdings ohne umfangreichere Untersuchungen beobachtet.

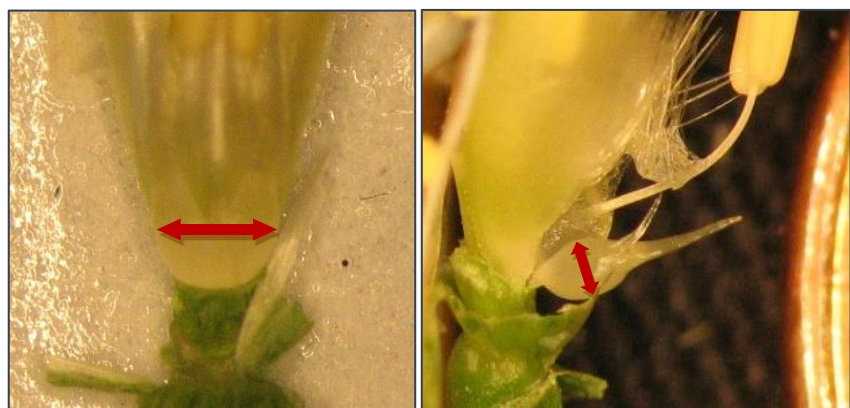


Abbildung 3 Präparierte Blüthen offenblütiger (a 143-Panther, b 154-Nord) Sorten im Vergleich zur kleistogamen Sorte ‚Aveia‘ (c) (Fotos: Sophie Brodführer)

Diese, von der Spelzenform verursachte, Kleistogamie hat einen hohen Spelzengehalt und eine schlechte Entspelzbarkeit zur Folge, was eine züchterische Nutzung in Frage stellt.

Als eine weitere mögliche Ursache für das kleistogame Blühen wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit (Vollmer 2020) untersucht, ob sich die Lodiculi von als kleistogam und chasmogam eingestuft Prüfgliedern in ihrer Größe vor, während und nach der Blüte voneinander unterscheiden. Dafür wurden bei den Blütchen einer Auswahl kleistogam ($n=10$) oder chasmogam ($n=10$) blühenden Prüfgliedern zum Blühzeitpunkt die Hüll- und Deckspelzen entfernt, anschließend die freigelegten Lodiculi in der Frontal- und in der Seitenansicht fotografiert (Abb. 4) und die Parameter „Breite“ (BR) und „Tiefe“ (TF) gemessen.

Abbildung 4 Präparierte Lodiculi in der Frontal-(links) und in der Seitenansicht (rechts). Das Blütchen steht kurz vor der Blüte. Die Lodiculi sind angeschwollen. (Fotos: Carolin Vollmer)



Die Lodiculi der als chasmogam eingestuften Prüfglieder waren zum Blühzeitpunkt im Mittel breiter als die Lodiculi der als kleistogam eingestuften Prüfglieder und es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Lodiculi-Breite nach der Blüte und der Offenblütigkeit ermittelt ($r=0.68^{**}$). Dieses deutet darauf hin, dass die beobachtete Kleistogamie bei einigen Sorten auf einer schwächeren Lodiculi-Funktion basiert. Diese Form der Kleistogamie erscheint züchterisch nutzbar und sollte weiter untersucht werden.

AP 2: Assoziation molekularer Marker mit Blühmerkmalen und Flugbrandresistenz

Strukturanalyse

Das Material des KLAR-Sortimentes stammt aus etwa 30 Zuchtprogrammen und 30 Ländern, wobei die Herkunft bei einigen Akzessionen nicht bekannt ist. Die in den Dendrogrammen der Abb. 5 dargestellten Verwandtschaftsverhältnisse spiegeln die tatsächlichen Abstammungen soweit sie bekannt sind sehr gut wider.

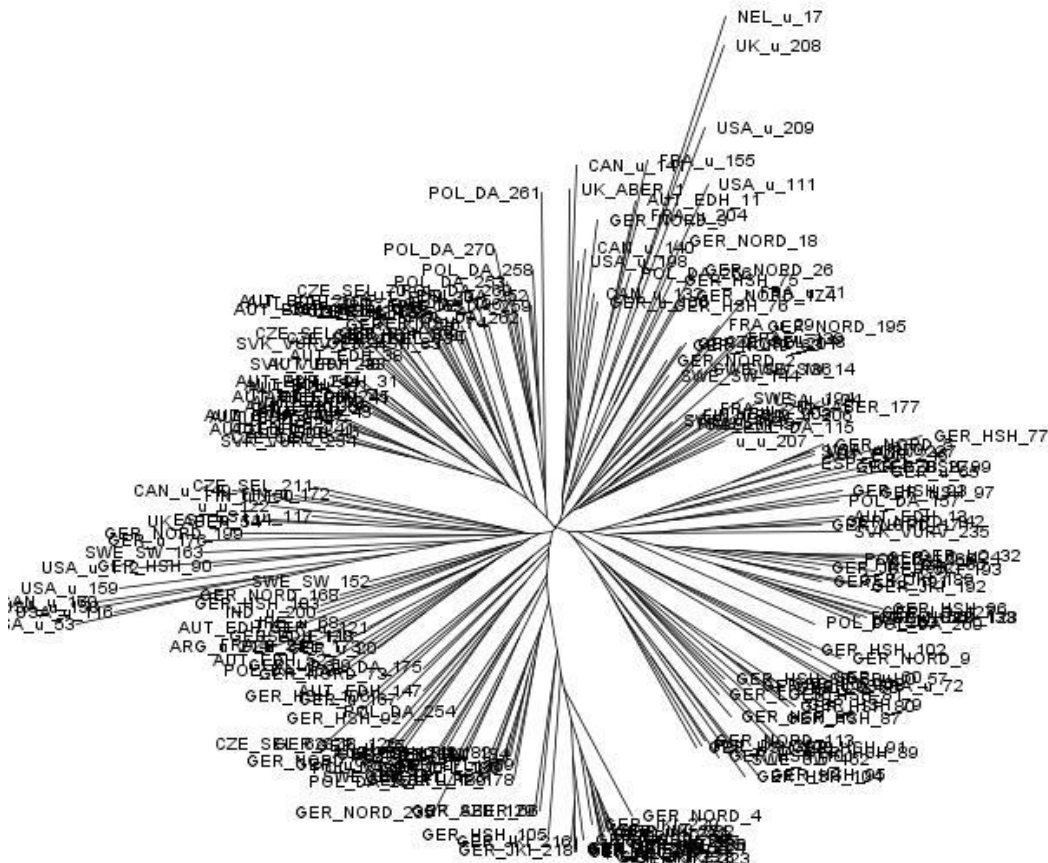


Abb. 5a Dendrogramm von KLAR1 basierend auf der Neighbor Joining Methodik. Die einzelnen Haferlinien sind mit Länderkürzel_Zuchtprogramm_Prüfgliednummer gekennzeichnet (Abkürzungen Züchterherkunft: u= unbekannt; ABER = Aberystwyth; NORD = Nordsaat, LO = Lochow-Petkus; DA = Dankow; HSH = LBS Dottenfelder Hof; SEL = Selgen; EDH = Saatzucht Edelhof; SZB = Saatzucht Bauer)

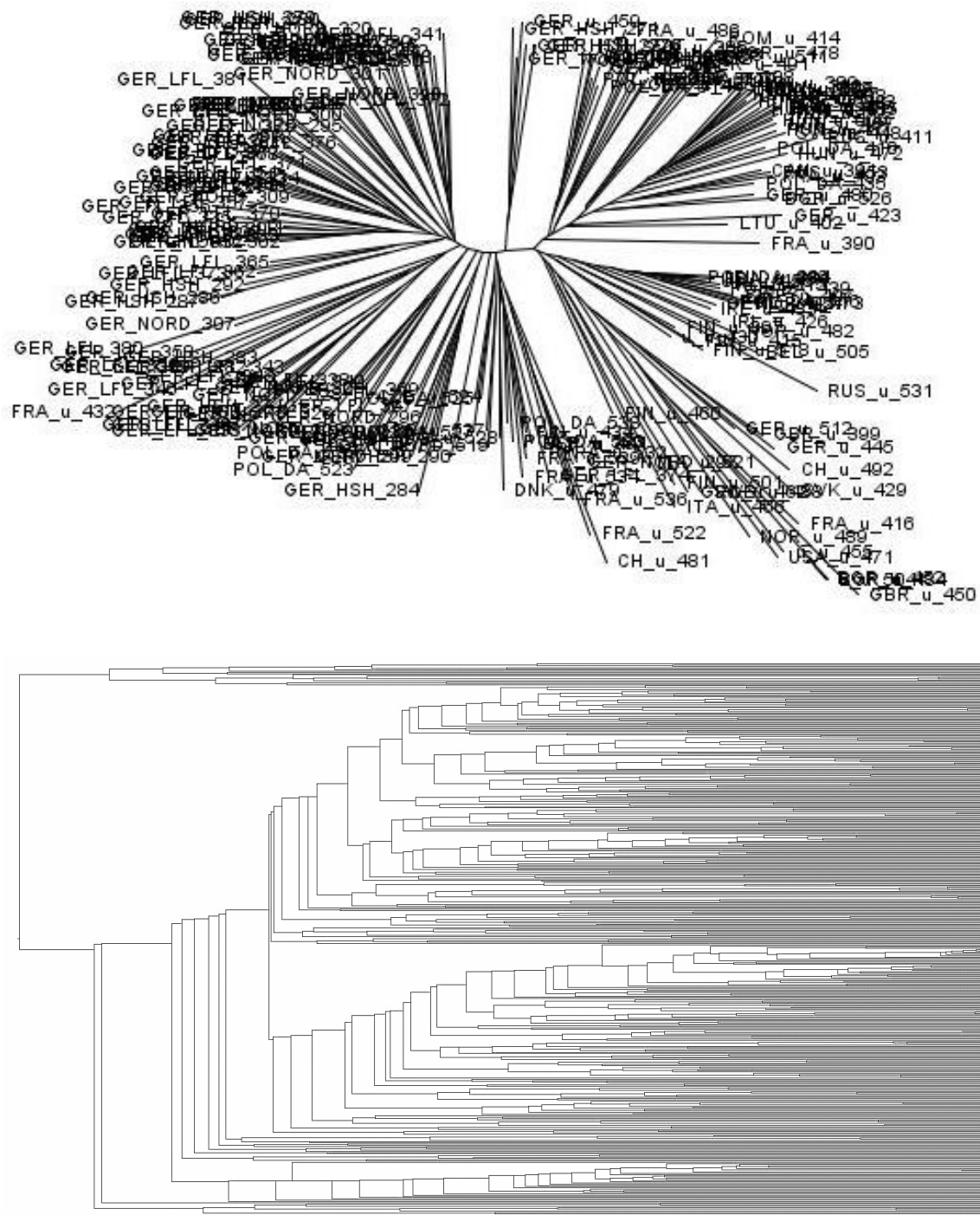


Abb. 5b Dendrogramme von KLAR2 (oben) basierend auf der Neighbor Joining Methodik, sowie des Gesamtsortimentes (unten), basierend auf UPGMA.

In den Dendrogrammen (Abb. 5b) ist erkennbar, dass die Zuchtstämme und Sorten aus den stärker involvierten Zuchtprogrammen der LBS (58 Prüfglieder), Nordsaat (70), Edelhof (44), LfL (60) und Danko (47) in verschiedenen Zweigen des Dendrogramms vertreten sind, was auf eine erfolgreiche Verhinderung genetischer Einengung hindeutet.

Sowohl in den Dendrogrammen als auch in den Punktdiagrammen der Hauptkomponentenanalysen in Abb. 6 sind Cluster erkennbar. In STRUCTURE wurde die optimale Clusterzahl zumeist mit der

Delta-K-Methodik (ΔK) (Evanno et al. 2005) berechnet. Für das gefilterte Gesamtsortiment ergaben sich dabei 18 Cluster, was eine vergleichsweise hohe Anzahl darstellt.

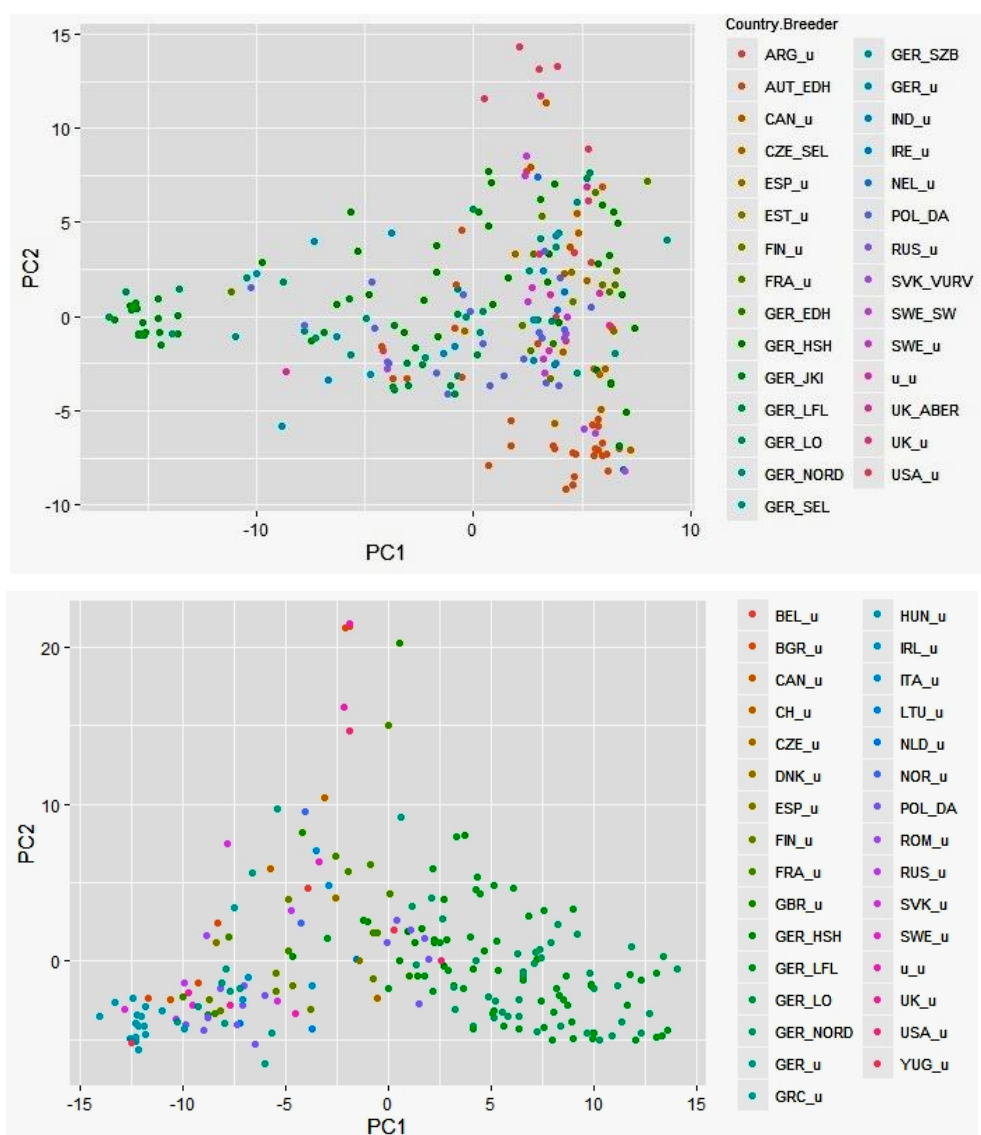


Abb. 6 Diagramme der Hauptkomponentenanalyse (PC1 vs. PC2) mit KLAR1 (oben) und KLAR2-Haferakzessionen (unten) sowie deren jeweilige Land-Züchterherkunft (Land_Zuchtprogramm; u= unbekannt; ABER = Aberystwyth; NORD = Nordsaat, LO = Lochow-Petkus; DA = Dankow; HSH = LBS Dottenfelder Hof; SEL = Selgen; EDH = Saatzucht Edelhof; SZB = Saatzucht Bauer)

Assoziationsanalyse

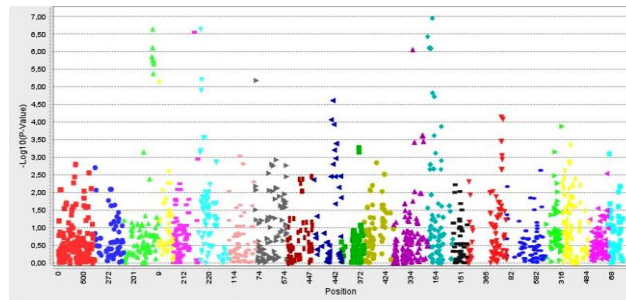
Angeichts der vergleichsweise moderaten Struktur des KLAR-Sortimentes wurden für die Assoziationsanalyse Modelle mit Einbindung der Hauptkomponenten (PC 1 bis 5) bzw. der Kinship-Matrix zur Berücksichtigung der Populationsstruktur gerechnet. Die Berechnungen wurden getrennt für KLAR1 und KLAR2 in TASSEL ausgeführt, sowohl via GLM+PCA als auch via MLM+PCA+K.

Abb. 7 Manhattan-Plots für die Sortimente KLAR1 und KLAR2 für die Merkmale UA, AR, OFL und KLI auf Basis des GLM+PCA-Modells

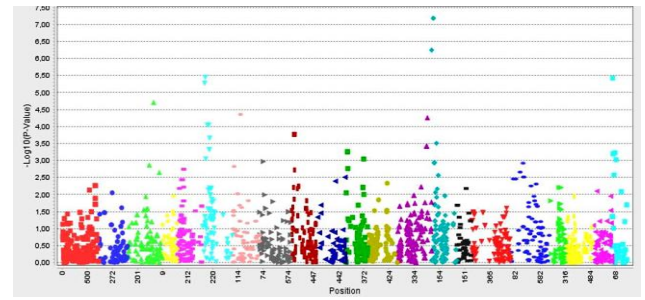
KLAR1

KLAR2

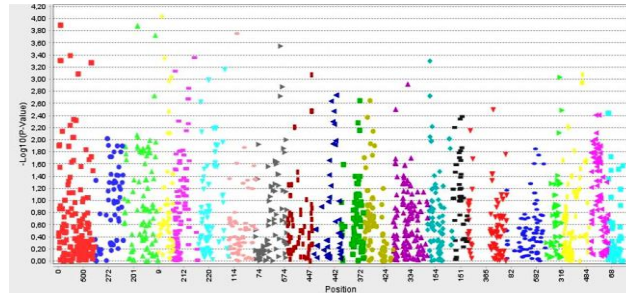
P-Values UA



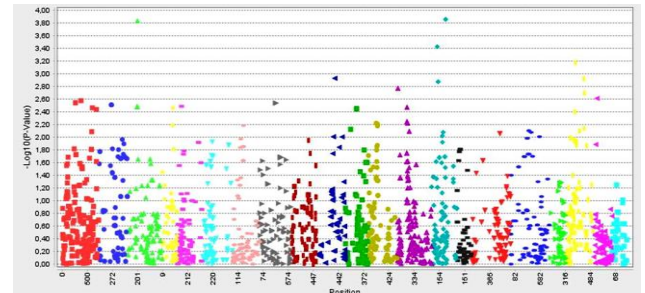
P-Values UA



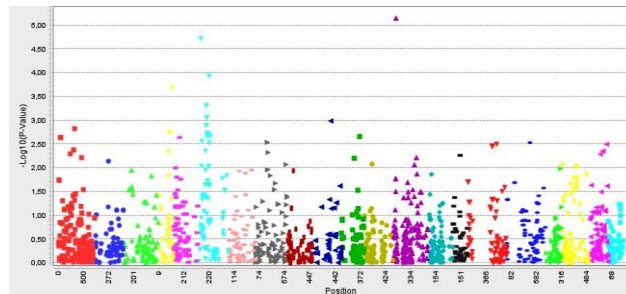
P-Values AR



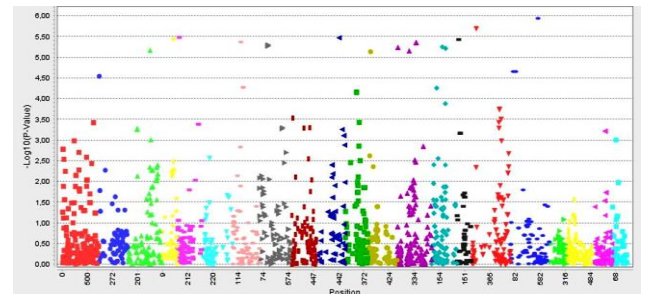
P-Values AR



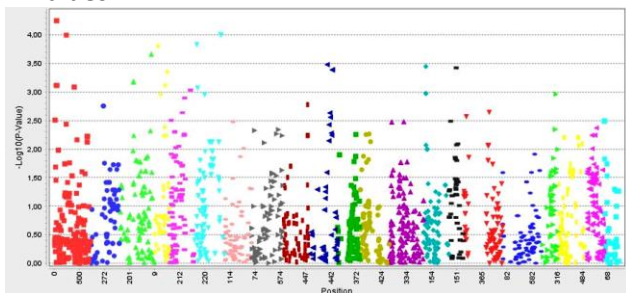
P-Values OFL



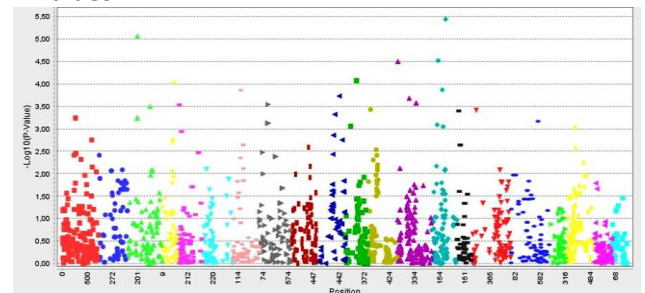
P-Values OFL



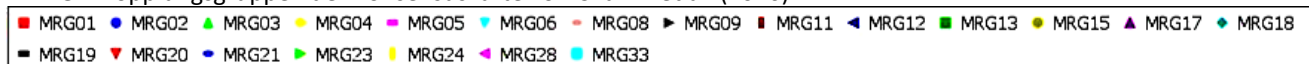
P-Values KLI



P-Values KLI



MRG = Kopplungsgruppen der Konsensuskarte von Chaffin et al. (2016)



Zwei Signifikanzkriterien wurden für die einzelnen MTAs festgelegt, (1) entweder ein lt. Benjamini-Hochberg-Korrektur signifikanter p-Wert in KLAR1 und KLAR2 im GLM+PCA-Modell oder (2) ein signifikanter p-Wert lt. Benjamini-Hochberg-Korrektur in einem der beiden Panels, aber in beiden Modellrechnungen.

Einen Überblick zu den Marker-Merkmal-Assoziationen (MTAs) bieten die Manhattan-Plots nach GLM+PCA zu den einzelnen Merkmalen (Abb. 7). Beim Vergleich der Diagramme zwischen KLAR1 und KLAR2 fällt eine gute Übereinstimmung bei UA auf, wogegen bei den Blühmerkmalen AR, OFL und KLI weniger ähnliche Muster zu erkennen sind. Die Anzahl signifikanter MTAs ist für UA auch deutlich größer als bei den drei Blühmerkmalen, die vermutlich weniger durch Majorgene gesteuert werden

als die UA. Im Merkmal AR waren keine MTAs mit Signifikanz über beide Sortimente nachzuweisen. Für OFL sind auffallend mehr signifikante MTAs im KLAR2 als im KLAR1 zu erkennen. Die Positionen der signifikanten MTAs in der Konsensuskarte sind in Abb. 8 dargestellt. So liegen hochsignifikante MTAs (grün) für UA auf den Kopplungsgruppen MRG05, MRG06, MRG12, MRG17 und MRG18.

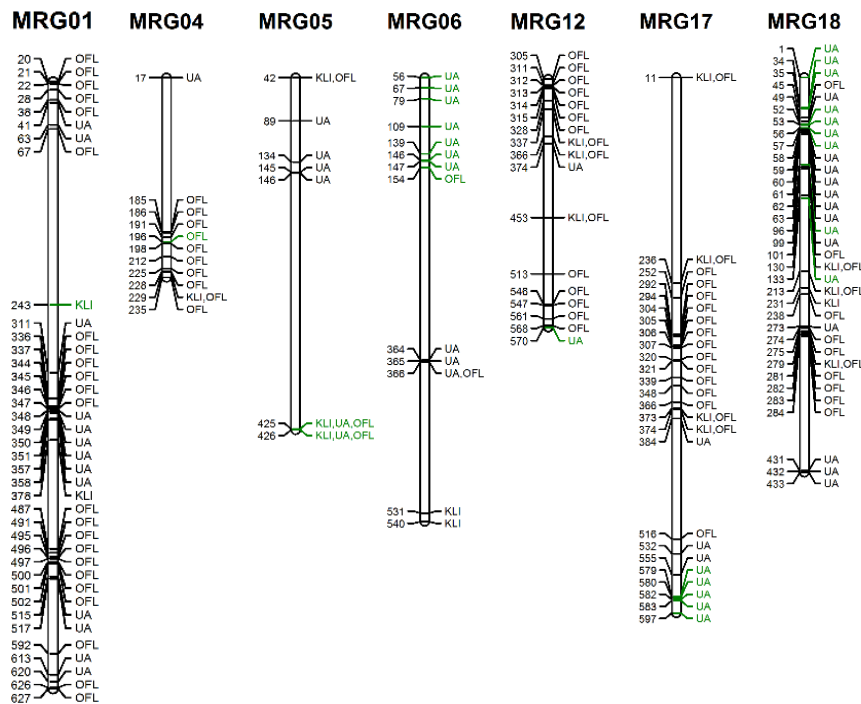


Abb. 8 Signifikante MTAs innerhalb der Konsensuskarte (Bekele et al. 2018) (schwarz: MTA nur für eines der beiden KLAR-Sortimente aber in beiden Modellrechnungen signifikant nach Benjamini-Hochberg; grün: signifikanter p-Wert in beiden KLAR-Sortimenten nach Benjamini-Hochberg)

Für die OFL sind MTAs auf MRG01, MRG04, MRG05 und MRG06 über beide Sortimente nachgewiesen. Des Weiteren gibt es zahlreiche Bereiche, in denen mehrere MTAs eng gekoppelt vorliegen. Mehrfach sind KLI und OFL gemeinsam mit einem Marker assoziiert.

AP 3: Nutzung von Kleistogamie für eine Verminderung der Flugbrandinfektion

In den Nachbauversuchen sollte die Frage beantwortet werden, ob geschlossenes Blühen die Flugbrandinfektion der Samenanlage reduziert und sich diese Pseudoresistenz als Alternative zur rassenspezifischen Resistenz nutzen lässt. Für diese Untersuchungen wurden ausschließlich anfällige bis mittelresistente Sorten ausgewählt, die die gesamte Spannweite der Offenblütigkeit abdecken. Die ursprünglich geplante Prüfung im Gewächshaus zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde um 5 Sorten auf 25 Sorten erhöht und um einen Freilandversuch mit 64 Prüfgliedern ergänzt.

Zum Nachbauversuch im Gewächshaus mit 25 Sorten liegen nunmehr Ergebnisse aus zwei Anbaujahren mit Ernteproben von vier Umwelten vor. Im Mittel über alle Sorten, Wiederholungen und Umwelten beträgt der Nachbaubefall 21 %, bei einem Vorjahresbefall von 41 %. Diese mittlere

Reduktion um ca. 50 % des Befalls schwankt zwischen den Sorten von 11 % bis 81 %. Zur Analyse des Effektes der Kleistogamie auf den Nachbaubefall wurden multiple Regressionsmodelle anhand der AIC-Werte und Residuenplots selektiert¹. Als Faktoren mit möglichem Einfluss auf den Nachbaubefall wurden das Anfälligkeitsniveau (SUSC), der Kleistogamieindex (KLI), der Anteil Brandrispen im ersten Jahr (UA1), welcher mit dem Infektionsdruck während der Blüte korreliert sein könnte, der Umwelteffekt (Site) sowie diverse Interaktionen geprüft.

Tabelle 3 Anova-Tabellen (Type III tests) der GLM der beiden Nachbauprüfungen

Nachbau im Gewächshaus, 25 Sorten				
Response: UAn				
LR	Chisq	Df	Pr(>Chisq)	
KLI	11.393	1	0.0007370	***
SUSC	30.676	1	3.049e-08	***
UA1	5.412	1	0.0200034	*
Site	49.391	3	1.077e-10	***
UA1:Site	19.557	3	0.0002096	***
Prüfung im Freiland, 64 Sorten 2018				
Response: UAn				
LR	Chisq	Df	Pr(>Chisq)	
KLI	12.674	1	0.0003708	***
SUSC	14.120	1	0.0001715	***
UA1	32.738	1	1.054e-08	***
Site	12.631	1	0.0003795	***

In den ANOVAs sind die Effekte für KLI, SUSC, UA1 und Site signifikant, wobei der Effekt der SUSC auf den Nachbaubefall deutlich stärker ist als jener des KLI (Tab. 3). Ähnliches ergab sich im zweiten Nachbauversuch, der Prüfung von 64 Sorten im Freiland. Auch hier war der Effekt von KLI schwächer als jener der SUSC und UA1 (Tab. 3).

In Abbildung 10 sind die Effekte der beiden Hauptfaktoren für den Nachbaubefall dargestellt. Darin zeigt sich eine Abnahme des Nachbaubefalls mit zunehmender Kleistogamie und abnehmender Anfälligkeit.

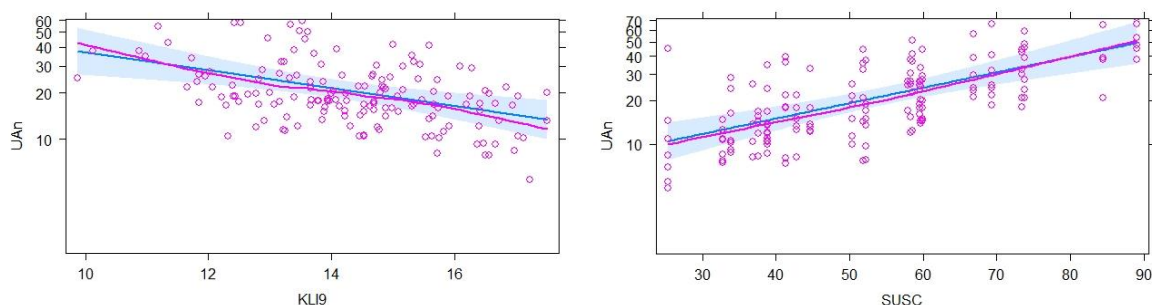


Abb. 10 Effektplots für das nach AIC-Vergleich optimale GLM zur Abhängigkeit des Nachbaubefalls (UAn) vom Kleistogamieindex (links) und dem Anfälligkeitsniveau (rechts)

¹ Für die Unterstützung bei der Berechnung der multiplen Regressionen danken wir Frau Dr. Doreen Gabriel (JKI)

In Abb. 11 ist die Abhängigkeit des Nachbaubefalls vom Kleistogamieniveau und von der Anfälligkeit im Feldversuch mit 64 Sorten als Punktdiagramm dargestellt. Hier zeigt sich ein geringerer Nachbaubefallswert sowohl bei hoher Kleistogamie ($KLI > 16$) als auch bei geringer Kleistogamie kombiniert mit mittlerer Anfälligkeit. Es muss also noch weitere Faktoren geben, die das Befallsniveau im Nachbau reduzieren.

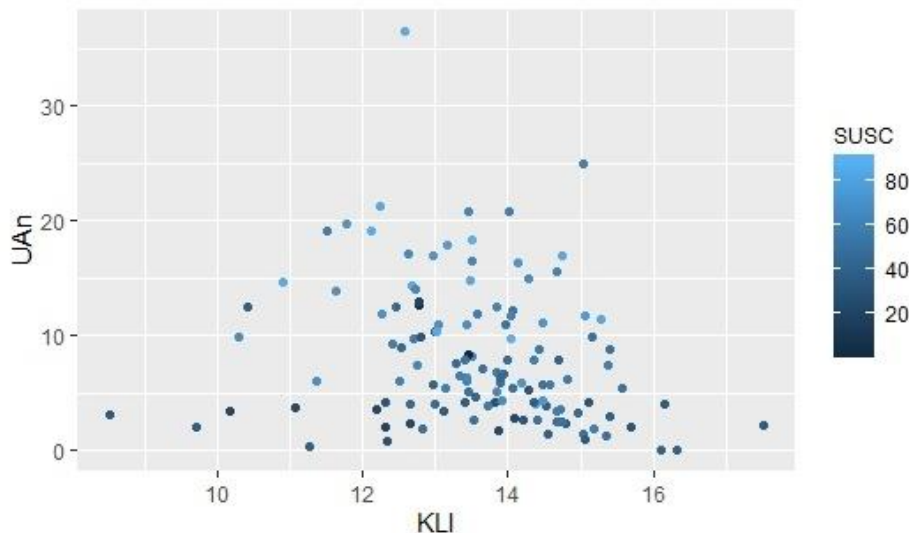


Abb. 11 Punktdiagramm mit der abhängigen Variablen Flugbrandbefall im Nachbau (UAN) und den Faktoren Kleistogamieindex (KLI) und Anfälligkeitsniveau (SUSC) im Freilandversuch mit 64 Sorten.

In Anbetracht der multiplen Einflussfaktoren auf den Nachbaubefall stellt sich die Frage nach deren Heritabilität. Im Nachbau im Gewächshausversuch lag diese bei 88 % und im Freilandversuch bei 77 %, insgesamt also auf ähnlichem Niveau wie die dominierenden Faktoren Anfälligkeitsniveau und Kleistogamie.

Im Rahmen einer Bachelorarbeit (Strebe 2020) wurde der Zusammenhang zwischen Offenblütigkeit und Flugbrandinfektion im Nachbau in einem Klimakammerversuch sowie der Temperatureinfluss auf die OFL untersucht. Dazu wurden sechs Sorten unter jeweils drei Temperaturregimes (14 °C, 22 °C, 28 °C) während der Blütezeit mit einer Flugbrandsuspension besprüht und die nachfolgende Generation hinsichtlich Flugbrandinfektion geprüft. Der in der Literatur beschriebene Einfluss der Temperatur auf die Offenblütigkeit konnte bestätigt werden, wobei die Sorten nicht einheitlich, sondern spezifisch reagierten. Als kleistogam unter allen Temperaturvarianten erwiesen sich die Sorten ‚Hecht‘ und ‚Aveia‘, die beide trotz Kleistogamie einen – wenn auch schwachen – Befall im Nachbau zeigten. Diese Beobachtung bestätigt die bereits in den Nachbauversuchen gewonnenen Ergebnisse mit der Sorte ‚Aveia‘, wonach vollständige Kleistogamie einen Befall im Nachbau nicht völlig verhindern kann und lediglich zur Reduktion der Keimlingsinfektion beiträgt.

5. Diskussion der Ergebnisse

AP1 Phänotypisierung der Blühmerkmale und Flugbrandresistenz

Die erfassten Merkmalsdaten können trotz extrem unterschiedlicher Witterungsverläufe an den Prüfumwelten und reduzierter Umweltzahl als hinreichend reproduzierbar und belastbar bezeichnet werden. Für die Prüfung der Flugbrandresistenz sind trockene Bodenverhältnisse zur Aussaat notwendig, was 2018 gegeben war und bei einigen Prüfgliedern zu 100%igem Befall geführt hat, ein ansonsten eher seltener Befund. Die Flugbranddaten von 2018, von je zwei Umwelten für KLAR1 und KLAR2, validiert durch die Ergebnisse an den übrigen Umwelten, sind deshalb eine gute Grundlage für die Assoziationsanalysen und für die Resistenzbewertung der Prüfglieder.

Bei mehreren Sorten aus KLAR1 wurde das in vorangegangenen Projekten gefundene Anfälligkeitsniveau gegenüber Flugbrand im Rahmen der KLAR-Prüfungen bestätigt. Dieses betrifft auch 6 Sorten aus dem internationalen Differentialsortiment zur Rassendifferenzierung bei Flugbrand. In einem vorangegangenen BLE-Projekt (FKZ 03OE647) wurden verfügbare Flugbrandrassen, einschließlich jener vom Dottenfelder Hof, mit Hilfe des Differentialsortimentes geprüft. Die dabei untersuchten Flugbrandrassen aus Deutschland unterschieden sich wenig und waren deutlich weniger aggressiv als eine kanadische Flugbrandrasse (Herrmann 2006). Der Befall der im KLAR-Projekt geprüften 6 Differentialsorten (Ergebnis nicht gezeigt) unterstützt die Annahme, dass sich die auf dem Dottenfelder Hof genutzte Rasse seit 2005 nicht verändert hat, was aufgrund der Nutzung hochanfälliger Sorten für die Flugbranderhaltung auch plausibel ist.

Aus älteren Studien ist bekannt, dass Flugbrandinfektionen selbst bei ausbleibender Zerstörung der Rispenanlage die Wüchsigkeit der Pflanze beeinflussen (Hubbard und Stanton, 1934). Für die im Projekt an den nicht-brandigen Rispen erfassten Vergleichsmerkmale Wuchshöhe und BBCH-Stadium wurden im Vergleich mit den Blühmerkmalen hohe Heritabilitäten gefunden, die jedoch in ähnlichen Versuchen ohne Flugbrandinokulation etwas höher sind. Da die Beeinflussung von Wuchshöhe und BBCH selbst bei latenter Infektion nicht genau schätzbar war, sind diese Daten aus dem KLAR-Projekt nur bedingt verwertbar.

Ein Schwerpunkt des Projektes lag auf den Blühmerkmalen. Die hierzu im Vorhaben erarbeiteten Daten zur OFL, AR und KLI haben Neuigkeitswert und sind züchterisch interessant. Vergleichbare Untersuchungen sind im Zusammenhang mit der Resistenzzüchtung gegen *Fusarium* in Norwegen (Tekle et al. 2020) und den eigenen Arbeiten publiziert (Herrmann et al. 2020). In diesen Arbeiten hat sich der bei Weizen und Gerste gefundene Zusammenhang zwischen Antherenextrusion und Mykotoxinakkumulation im Wesentlichen bestätigt. Sowohl starke Offenblütigkeit bzw. hohe AE als auch Kleistogamie reduzieren die Mykotoxinakkumulation, sind aber nicht die einflussreichsten Faktoren für den Mykotoxingehalt.

Der zeitliche Aufwand für die Auszählung der AR war beträchtlich, könnte aber zukünftig, wenn es um die Selektion auf hohe Kleistogamie geht, auf die Rispen spitze und die äußeren Blüten der Rispenzweige reduziert (halbiert) werden, da es vor allem in diesen Rispenbereichen eine stärkere AE gibt und Differenzen zwischen den Sorten in diesen Rispenpositionen auftreten.

AP2 Assoziationsanalyse

Bei der Berechnung von Marker-Merkmal-Assoziationen muss die Populationsstruktur berücksichtigt werden, um sowohl den Fehler erster (falsch positive) als auch zweiter Art (falsch negative) gering zu halten (Matthies et al. 2012). Anhand der Dendrogramme und PCA-Plots waren Cluster erkennbar, jedoch nicht so distinkt wie in anderen Studien, wo z. B. Winter- von Sommerformen deutlich abgegrenzte Cluster bildeten. Die Analyse des gesamten Sortimentes mit STRUCTURE ergab 18 Cluster als optimale Struktur. Anhand von Vergleichen mit ähnlichen Arbeiten (z. B. Sonah et al. 2015) haben wir die Struktur als moderat eingestuft und die beiden oben genannten Modelle für die Assoziationsanalysen gewählt.

Die genom-basierten Dendrogramme und die Kinshipmatrix bestätigen oder präzisieren die bereits bekannten Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Sorten und Zuchtstämmen. Zugleich konnten 29 genetische Klongruppen anhand der genetischen Distanz identifiziert werden, darunter auch Paare von Sorten, die unter verschiedenen Namen vermarktet wurden.

In den Assoziationsanalysen wurden in sieben Kopplungsgruppen zahlreiche MTAs für UA, KLI und OFL gefunden, wobei die Berechnungen via MLM+PCA+K deutlich konservativer mit folglich weniger Treffern als via GLM+PCA ausfallen. Allein für das erste Sortiment, ohne Validierung durch KLAR2, liegen bei der GLM+PCA-Berechnung auf allen 21 Kopplungsgruppen signifikante MTAs.

Die über beide KLAR-Panel signifikanten MTAs für Flugbrandresistenz auf Mrg05, Mrg06, Mrg12, Mrg17 und Mrg18 sind ein Beleg für mehrere verschiedene Resistenzgene im Sortiment, was angesichts des Ursprungs der Prüfglieder aus mindestens 30 Zuchtprogrammen und der in früheren Arbeiten (Nicolaisen 1934, Reed and Stanton 1938, Nielsen 1977, Wilcoxson und Stuthman 1993, Schattenberg 1934, Moule 1957, Miczynski 1955, Bartoš 1964) beschriebenen Vielzahl an Resistenzquellen nicht überrascht. Über die chromosomale Position und Charakterisierung von Resistenzgenen gegen Haferflugbrand ist bislang sehr wenig bekannt. Kibite et al. (2004) berichteten über drei Resistenzgene auf KO-14 in der Kanota x Ogle-Konsensuskarte (O'Donoghue et al. 1995), inzwischen der Kopplungsgruppe Mrg06 (Chaffin et al. 2016) zugeordnet, auf der auch im KLAR-Panel signifikante MTAs in zwei Regionen gefunden wurden. Mrg06 ist auch die einzige Kopplungsgruppe mit signifikanten MTAs nach GWAS mit Flugbranddaten zum CORE-panel in 2010 in Winnipeg, welches aus 433 Linien vorwiegend amerikanischen Ursprungs besteht. Die Daten sind auf der T9/oats-Seite hinterlegt (https://triticeaetoolbox.org/oat/downloads/select_genotype.php) und wurden für den Vergleich mit den KLAR-Ergebnissen via EMMA + REML verrechnet. Einen weiteren

QTL zur Flugbrandresistenz auf Mrg06 beschreibt Fields (2017). Darin werden zwei Resistenz-QTL beschrieben, einer auf Mrg06 und der stärkere auf Mrg33, auf der im vorliegenden Projekt nur für KLAR1 ein signifikanter QTL gefunden wurde.

Bei den Blühmerkmalen wurden für OFL und KLI mehrere über beide Sortimente signifikante MTAs gefunden, nicht jedoch für die hoch heritable AR. Letztere scheint noch mehr als die beiden anderen Merkmale von vielen Minor-QTL gesteuert zu werden. Bei Weizen wird die AE als Pendant zur AR ebenfalls eher durch Minor-QTL gesteuert, wobei die stärksten MTAs mit dem *Rht*-D1-Gen assoziiert sind (Muqaddasi et al. 2016 und 2017).

AP3 Pseudoresistenz: Nutzung von Kleistogamie für eine Verminderung der Flugbrandinfektion

In umfangreichen Versuchen konnte Petersen (1960) am Wirt/Pathogen-System Gerste/Flugbrand zeigen, dass die Nutzung der Kleistogamie züchterisch effektiver als die Resistenzzüchtung über Infektionstests ist. Pedersen (1960) empfiehlt bei zweizeiliger Gerste die Erfassung der Antherenextrusion als indirektes und sicher erfassbares Merkmal, welches mit der Offenblütigkeit korreliert und als Pseudoresistenz genutzt werden kann. Dieser Vorschlag hat sich vermutlich aufgrund der Entwicklung effizienter Beizmittel bei der Gerste nicht durchgesetzt. Im Rahmen des KLAR-Projektes sollte die Übertragbarkeit dieser Idee auf den Hafer geprüft werden. Als Voraussetzungen dafür sind (i) eine ausreichende genetische Variation für Kleistogamie, (ii) keine negativen Effekte der Kleistogamie auf wichtige Zuchtmerkmale und (iii) ein hinreichender flugbrandreduzierender Effekt der Kleistogamie zu nennen.

Bei Betrachtung der genetischen Variation für Kleistogamie konnten im vorliegenden Projekt eine relativ geringe Anzahl mittel bis stark kleistogamer Hafersorten identifiziert werden. Dabei ergibt sich aber zwangsläufig die Frage, welches Kleistogamieniveau notwendig ist, um Flugbrand im Nachbau wirksam zu reduzieren. Eine umfassende Antwort auf diese Frage lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht ableiten, da der Nachbaubefall sowohl von der Resistenz, dem Kleistogamieniveau und unbekannten Faktoren abhängt.

In den vorliegenden Versuchen unter für die Keimlingsinfektion optimalen Bedingungen im Gewächshaus zeigte sich im Sortenmittel eine Halbierung des Befalls im Nachbau im Vergleich zum Vorjahr nach künstlicher Infektion. Der Nachbaubefall von 64 Sorten im Freiland 2018, unter sehr infektionsgünstigen Bedingungen, lag im Sortendurchschnitt bei 30 % relativ zum Vorjahresbefall. In den Versuchen von Sperlingsson (2004) lag der Nachbaubefall bei etwa der Hälfte des Vorjahresbefalls und bei Herrmann (2006) fiel der Nachbefall mit 4,4 % vom Vorjahresbefall noch deutlich geringer aus. Anhand der vorliegenden Ergebnisse und der Literatur kann man eine deutliche Reduktion des Nachbaubefalls im Vergleich zum Vorjahresbefall konstatieren. Ob sich diese Reduktion mit jeder Generation fortsetzt und gegen Null tendiert, kann nicht eingeschätzt werden, da Ergebnisse dazu fehlen. Es erscheint aber lohnenswert, diese Frage zu untersuchen, womit

zugleich das zur Verhinderung von Flugbrand notwendige Resistenzniveau genauer definiert werden kann.

Bei Betrachtung der morphologischen Kleistogamieursachen weisen die vorliegenden Ergebnisse auf zwei unterschiedliche Ursachen hin, erstens auf eine besondere Spelzenmorphologie und zweitens auf funktionsschwächere Lodicae. Für erstere, beobachtet in ‚Aveia‘ und zwei weiteren Prüfgliedern, sind negative Effekte auf den Spelzengehalt und die Entspelzbarkeit wahrscheinlich, weshalb diese Kleistogamietypen nicht nutzbar sind. Für den Lodicae-abhängigen, dem vermutlich häufigeren Typ der Kleistogamie, sind keine negativen Effekte bekannt, was aber zu untersuchen wäre.

Die bisherigen Regressionsberechnungen mit den Nachbauergebnissen von Hafersaatgut, welches unter starkem Infektionsdruck von der Blüte bis Ernte gereift ist, belegen einen insgesamt schwachen aber signifikanten Effekt des Kleistogamieniveaus auf den Nachbaubefall. Den stärksten Einfluss auf den Nachbaubefall hat die Resistenz, die auch nach Blüteninfektion wirksam ist (Nicolaisen 1934). Die Blüteninokulation wurde schon in den 1930er Jahren wegen der Sortenunterschiede im Blühzeitraum und der Offenblütigkeit als ungeeignete Methode für die Resistenzzüchtung bezeichnet.

Als Schlussfolgerung aus den Projektergebnissen kann die Selektion auf geringe Offenblütigkeit in Kombination mit der Resistenzprüfung empfohlen werden, da sowohl die Infektion mit Flugbrand als auch jene mit Fusarium reduziert werden kann. Unter den modernen Zuchtstämmen sind dabei einige, die ohne gezielte Selektion ein hohes Kleistogamieniveau aufweisen. Bei der Selektion auf Kleistogamie muss die Spelzenmorphologie beachtet werden. Eine unvorteilhafte Spelzenmorphologie kann sowohl im Rahmen der Kreuzungsarbeiten als auch beim Entspelzen identifiziert werden. Die Faktoren für den Nachbaubefall müssen weiter erforscht werden, um sowohl das praktisch notwendige Resistenz- als auch Kleistogamieniveau schätzen zu können.

6. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Da ein hohes Kleistogamieniveau sowohl gegen Flugbrand- als auch Fusariuminfektionen wirkt, sollte es in den Zuchtprozess integriert werden. Im Projekt wurden die Methoden der Erfassung der Kleistogamie etabliert, weitere Effizienzsteigerungen bei der AR-Erfassung sind möglich. Die nun bekannten Daten zur Flugbrandresistenz, zur genetischen Divergenz der Haferstämme und auch zum Kleistogamieniveau werden in der Sortenentwicklung berücksichtigt.

7. Gegenüberstellung der geplanten und erreichten Ziele

Ziele	Erreichungsstand; weiterführende Fragestellungen
Erfassung der Blühmerkmale und Resistenzprüfung von 270 Hafergenotypen	Durch die Sortimentsverdopplung erfüllt. Die Kleistogamieursachen müssen genauer erforscht werden. Des Weiteren wäre der Infektionsvorgang bei den kleistogamen Sorten zu untersuchen.
Assoziationsanalyse	Erstanalyse abgeschlossen. Erneute Analysen mit neuerer Software sind in Bearbeitung.
Nachbauprüfungen	Deutlich mehr als geplant am KLAR1-Sortiment geprüft. Weitere Prüfungen am KLAR2-Sortiment sind in Bearbeitung. Es sollte künftig erforscht werden, welches Niveau der Kleistogamie und des Resistenzniveaus notwendig ist, um Nachbaubefall zu verhindern.

8. Zusammenfassung

Das Verbundprojekt „Kleistogamer Hafer zur nachhaltigen Vermeidung von Flugbrand (KLAR)“ hatte zum Ziel, die ökologische Haferzüchtung mit neuen Erkenntnissen zur Resistenz und den Blüheigenschaften an einem Sortiment von 540 Hafergenotypen zu unterstützen und somit langfristig zu geringeren Verlusten in der Saatgutproduktion von Ökohafer durch Flugbrand beizutragen. Zu diesem Zweck wurden zwei Sortimente (KLAR1 und KLAR2, je 270 Prüfglieder) mehrortig im Zeitraum 2017 bis 2019 auf Offenblütigkeit (OFL), Antherenretention (AR) und Flugbrandresistenz (UA) nach künstlicher Inokulation geprüft. Vom Erntegut aus den Resistenzprüfungen wurden anfällige Sorten mit divergierender AR für Nachbauversuche ausgewählt, um den Effekt der Kleistogamie auf den Nachbaubefall schätzen zu können und die Frage zu beantworten, ob Kleistogamie zur Vermeidung von Flugbrandinfektionen genutzt werden kann. Die phänotypischen Ergebnisse wurden zudem für eine genomweite Assoziationsanalyse genutzt, für die beide Sortimente zuvor über GBS genotypisiert wurden.

Die Resistenzprüfungen ergaben gut reproduzierbare Daten mit hoher Heritabilität für UA und AR bei etwas geringerer Heritabilität für OFL. Zur präziseren Einschätzung der Kleistogamie wurde ein Kleistogamieindex (KLI) aus OFL und AR errechnet, da keines der beiden Merkmale allein die Kleistogamie ausreichend präzise abbildet. Im Sortiment war etwa ein Viertel (134) der 540 Prüfglieder hochresistent gegen Flugbrand. Offenblütigkeit, AR und Kleistogamieindex (KLI) sind als quantitative Merkmale zu betrachten. An ausgewählten kleistogamen Sorten wurden erste Untersuchungen zu den Kleistogamieursachen vorgenommen. Als ursächlich für stärkere

Geschlossenblütigkeit kommen demnach sowohl eine die Blüte stärker einschließende Spelzenmorphologie als auch funktionsschwache Lodiculi infrage.

In den Assoziationsanalysen konnten signifikante Marker-Merkmalsassoziationen (MTAs) identifiziert werden. Für die Flugbrandresistenz wurden MTAs auf den Kopplungsgruppen MRG05, MRG06, MRG12, MRG17 und MRG18 nachgewiesen. Bei der OFL und dem KLI liegen MTAs auf MRG01, MRG04, MRG05 und MRG06 der internationalen Konsensuskarte.

In den Nachbauversuchen wiesen die multiplen Regressionen signifikante Effekte seitens der Resistenz und auch des Kleistogamieniveaus auf den Nachbaubefall nach. Die Voraussetzungen für die Nutzung der Kleistogamie als Pseudoresistenz sind also grundsätzlich gegeben, allerdings ist das dafür notwendige Kleistogamie- und Resistenzniveau mit den bisherigen Daten nicht klar definierbar. Zudem muss bei der Selektion auf hohen KLI die Spelzenmorphologie beachtet werden, da ein höherer Spelzengehalt oder eine schlechte Entspelzbarkeit nicht erwünscht sind. Grundsätzlich lässt sich mit einer höheren Kleistogamie aber sowohl die Infektion mit Flugbrand als auch mit Fusarium reduzieren.

9. Literaturverzeichnis

- Bartoš, P. 1964: Varietal resistance of oats to loose smut. Rostlinná Výroba, p. 409–422
- Benjamini, Y., and Y. Hochberg 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society B 57: 289–300.
- Bjørnstad, Å.; Tekle, S.; Lillemo, M.; Buraas, T.; Reitan, L. 2016: Breeding resistant cultivars to reduce mycotoxin risks in oats. In Proceedings of the 10th International Oat Conference, St. Petersburg, Russia, 11–15 July 2016.
- Bonnett, O. T. 1961: The oat plant: its histology and development. 111. Agr. Exp. Sta. Bui. 672. 112p.
- Brown, Ch. M. and H. L. Shands 1956: Factors Influencing Seed Set of Oat Crosses. Agron. J. 48: 173–177.
- Buerstmayr, M., and H. Buerstmayr 2015: Comparative mapping of quantitative trait loci for Fusarium head blight resistance and anther retention in the winter wheat population Capo × Arina. Theor. Appl. Genet. 128: 1519–1530.
- Callaghan, A. R. 1931: A study of anthesis in cultivated oats. Agr. Gas. N.S. Wales, 311–321
- Chaffin, A.S., Y.F. Huang, S. Smith, W.A. Bekele, E. Babiker, B.N. Gnanesh, B.J. Foresman, S.G. Blanchard, J.J. Jay, R.W. Reid, C.P. Wight, S. Chao, R. Oliver, E. Islamovic, F.L. Kolb, C. McCartney, J.W. Mitchell Fetch, A.D. Beattie, Å. Bjørnstad, J.M. Bonman, T. Langdon, C.J. Howarth, C.R. Brouwer, E.N. Jellen, K.E. Klos, J.A. Poland, T.F. Hseih, R. Brown, E. Jackson, J.A. Schlueter, and N.A. Tinker 2016: A consensus map in cultivated hexaploid oat reveals conserved grass synteny with substantial sub-genome rearrangement. Plant Genome 9. doi:10.3835/ plantgenome2015.10.0102
- Coffman, F.A. 1937: Factors influencing seed set in oat crossing. J. Hered. 28: 296–303.
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol., 14:2611–2620.
- Fatunla T., K. J. Frey 1980: Analysis of Genetic Changes in Radiated and Non-radiated (*Avena sativa* L.) Populations. Theor. Appl. Genet. 56,199–202.

- Foresman B.J., Oliver R.E., Jackson E.W., Chao S., Arruda M.P., Kolb F.L., 2016: Genome-Wide Association Mapping of Barley Yellow Dwarf Virus Tolerance in Spring Oat (*Avena sativa* L.). PLoS ONE 11(5): e0155376. doi:10.1371/journal.pone.0155376.
- Garber R.J. and Quisenberry K.S. 1927: Natural crossing in oats at Morgantown, West Virginia. Jour. Amer. Soc. Agron., 19: 191–196.
- Griffee, F., and Hayes, H. K. 1925: Natural crossing in oats. J. Amer. Soc. Agron., 17: 545-549.
- Hammer, K., 1975: Die Variabilität einiger Komponenten der Allogamie neigung bei der Kulturgerste (*Hordeum vulgare* L.s. l.). Kulturpflanze 23: 167–180.
- Herrmann, Matthias Heinrich, Juho Hautsalo, Paulina Georgieva, Adalbert Bund, Mark Winter, Steffen Beuch, 2020: Relationship between genetic variability of flowering traits and Fusarium mycotoxin contamination in oats. Crop Sci. 1–11. <https://doi.org/10.1002/csc2.20125>
- Herrmann, M. 2006: Züchtung von Hafer für den ökologischen Landbau. Schlussbericht zu den Projekten 03OE647/1 und 03OE647/2. <https://orgprints.org/15437/>
- Hubbard V. C. and T. R. Stanton, 1934 Influence of smut infection on plant vigor and other characters in smut-resistant oat varieties. Jour. Agr. Res. 49: 903- 908
- Kibite, S., J.G. Menzies and P.L. Thomas. 2000: Inheritance of resistance to three pathotypes of loose smut of oats. In: R. Cross et al. (eds.) Proc. 6th Int. Oat Conf., pp. 298–302.
- Kibite, S.; Rosnagel, B.; Eckstein, P.; Hay, D.; Menzies, J.; Dill-Macky, R.; Scoles, G., 2004: A molecular marker for, and the organization of, a cluster of loose smut resistance genes in oat. Proceedings 7th International Oat Conference / P. Peltonen-Sainio and M. Topi-Hulmi (eds.) Agrifood Research Reports 51, p. 183.
- Klos, K.E., Y.-F. Huang, W.A. Bekele, D.E. Obert, E. Babiker, A.D. Beattie, et al. 2016: Population genomics related to adaptation in elite oat germplasm. Plant Gen. doi:10.3835/plantgenome2015.11.0113.
- Kolk L.A., 1930: Relation of host and pathogen in the oat smut, *Ustilago avenae*. Bulletin of the Torrey Club. Vol. 57, 443–507.
- Kubo K., Fujita M., Kawada N., Nakajima T., Nakamura K., Maejima H., Ushiyama T., Hatta K., Matsunaka H. 2013: Minor differences in anther extrusion effect resistance to Fusarium head blight in wheat. J. Phytopathol. 161:308–314.
- Marshall, H. G. 1962. Effect of Wetting and Shading Bags on Seed Set of Oat Crosses. Crop Sci. 2: 4: 365–366.
- Matthies, I.E., T.V. Hintum, S. Weise, and M.S. Roder. 2012. Population structure revealed by different marker types (SSR or DArT) has an impact on the results of genome-wide association mapping in European barley cultivars. Mol. Breed. 30:951–966. doi:10.1007/s11032-011-9678-3
- Miczynski, K. 1955: Studies on the susceptibility of oat varieties to smut – Part II (in Polish). Acta Agrobotanica 3: 179–217.
- Mills, J.T. 1966: The development of loose smut (*Ustilago avenae*) in the oat plant with observations on spore formation. Trans. Br. Mycol. Soc. 49: 651–663.
- Misono, G. 1936: Ecological and physiological studies on the blooming of oat flowers. J. Faculty Agr., Hokkaido Imp. Univ. 37: 211–337. Sapporo, Japan.
- Moldenhauer, I. 1927: Untersuchungen über die Empfänglichkeit der Wild- und Kulturhaferformen für *Ustilago avenae* mit besonderer Berücksichtigung des Infektionsvorganges, Kühn-Archiv 15: 349–405.
- Moule, C. 1957: La resistance au charbon nu chez l'avoine cultivee. Ann. Amelior. Plantes 7: 159–198.

- Muqaddasi QH, Ulrike Lohwasser, Manuela Nagel, Andreas Börner, Klaus Pillen, Marion S. Röder, 2016: Genome-Wide Association Mapping of Anther Extrusion in Hexaploid Spring Wheat. PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0155494
- Muqaddasi QH, Pillen K, Plieske J, Ganal MW, Roder MS (2017b) Genetic and physical mapping of anther extrusion in elite European winter wheat. PLoS One 12:e0187744
- Nicolaisen, W. 1931: Beitrag zur Immunitätszüchtung des Hafers gegen *Ustilago avenae* (Pers.) Jens. Z. Züchtg.: A. Pflanzenzüchtg. Bd. 16, Heft 2: 256–278.
- Nicolaisen, W. 1934: Die Grundlagen der Immunitätszüchtung gegen *Ustilago avenae* (Pers.) Jens.. Z. Züchtg.: A. Pflanzenzüchtg. Bd. 19 Heft 1: 1–56.
- Nicolaisen, W. 1950: Hafer, *Avena sativa* L. Handbuch der Pflanzenzüchtung, zweiter Band, Hrsg. Th. Roemer und W. Rudolf. S. 224–288.
- Nielsen, J. 1977: A collection of cultivars of oats immune or highly resistant to smut. Can. J. Plant Sci. 57: 199–212.
- Nielsen, J. 1978: Frequency and geographical distribution of resistance to *Ustilago* in six wild species of Avena. Can. J. Plant Sci. 58:1099–1101.
- Nishiyama I. 1970: Four types of flowering time in *Avena*. JAPAN.J . GENETICS. Vol. 45, No. 5: 399–409.
- O'Donoghue, L.S., M.E. Sorrells, S.D. Tanksley, E. Autrique, A.V. Deynze, S.F. Kianian, et al. 1995. A molecular linkage map of cultivated oat. Genome 38:368–380. doi:10.1139/g95-048
- Oliver R.E., Lazo G.R., Lutz J.D., Rubenfield M.J., Tinker N.A., Anderson J.M., Brown Guedira GL, Chao S., Beattie A.D., Carson M.L., Rines H.W., Obert D.E., Bonman J.M., Jackson E.W. 2011: Model SNP development for complex genomes based on hexaploid oat using high-throughput 454 sequencing technology. BMC Genomics.; 12:77.
- Oliver R.E., Tinker N.A., Lazo G.R., Chao S., Jellen E.N., Carson M.L., Rines H.W., Obert D.E., Lutz J.D., Shackelford I., Korol A.B., Wight C.P., Gardner K.M., Hattori J., Beattie A.D., Bjørnstad Å., Bonman J.M., Jannink J.L., Sorrells M.E., Brown-Guedira G.L., Mitchell Fetch J.W., Harrison S.A., Howarth C.J., Ibrahim A., Kolb F.L., McMullen M.S., Murphy J.P., Ohm H.W., Rossnagel B.G., Yan W., Miclaus K.J., Hiller J., Maughan P.J., Redman Hulse R.R., Anderson J.M., Islamovic E., Jackson E.W. 2013: SNP Discovery and Chromosome Anchoring Provide the First Physically-Anchored Hexaploid Oat Map and Reveal Synteny with Model Species. PLoS ONE 8(3): e58068. doi:10.1371/journal.pone.0058068.
- Pedersen, P. N. 1960. Methods of testing the pseudo-resistance of barley to infection by loose smut, *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr. Acta Agric. Scand. 10: 312–332.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics; 155(2):945–59. PMID: 10835412
- Reed, G.M. and Stanton T.R. 1938: Inheritance of resistance to loose and covered smuts in Markton oat hybrids. J. Agric. Res. 56: 159–176.
- Reed, G.M., T.R. Stanton and G.J. Wilds 1947: Reaction of oat varieties and selections to physiologic races A-30 and A-31 of loose smut. J. Amer. Soc. Agron. 39: 1077–1087.
- Reed, G.M.; M.A. Griffiths and F.N. Briggs 1925: Varietal susceptibility of oats to loose and covered smuts. USDA, Washington D.C., Department Bull. No. 1275: 1–37.
- Sampson, K. and Western J.H. 1938: Biology of oat smuts. V. A ten years' survey of six spore collections. Propagation, screening and monospore isolation experiments. Ann. Appl. Biol. 25: 490–505.
- Schmehe, B. und H. Spieß 2011: Ergebnisse der Prüfung aktuell zugelassener deutscher und österreichischer Hafersorten auf Flugbrandresistenz und Evaluierung von Inokulationsverfahren. Band 1 des Tagungsbandes der 11. Wissenschaftstagung Ökologischer

- Landbau. Eds. Leithold, G.; Becker, K.; Brock, C.; Fischinger, S.; Spiegel, A.-K.; Spory, K.; Wilbois, K.-P. und Williges, U.; Es geht ums Ganze: Forschen im Dialog von Wissenschaft und Praxis. Beiträge zur 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Justus-Liebig-Universität Gießen, 15.-18. März 2011, 344–347. http://orgprints.org/view/projects/int_conf_2011_wita.html
- Schattenberg, H. 1934: Untersuchungen über das Verhalten von Sorten, Kreuzungsnachkommenschaften und Kreuzungspopulationen gegenüber verschiedenen Herkünften von Haferflugbranden. Kühn-Archiv 37: 411–449.
- Sonah, H., O'Donoghue L, Cober E, Rajcan I, Belzile F. 2015: Identification of Loci Governing Eight Agronomic Traits using a GBS-GWAS Approach and Validation by QTL Mapping in Soybean. Plant Biotechnol J. 2015;3(2):211–21.
- Sperlingsson K. 2004: Varietal difference between artificial and natural infection of *Ustilago avenae*. The importance of size of kernels and main location of infection. Seed Testing International No. 128, 19–22.
- Stanton T. R., and Coffman F.A. 1924: Natural crossing in oats at Akron, Colorado, J. Amer. Soc. Agron. 16: 646–659.
- Stein, N., Herren, G., and Keller, B. (2001). A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. Plant Breed, 120, 354–356. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00615.x>
- Stråbø, S. 2015: Genetic Variation of Anther Extrusion in Oat and Its Relationship to *Fusarium*. Master's Thesis, Norwegian University of Life Sciences, January 2015.
- Strebe, A. 2020: Überprüfung der Wirksamkeit kleistogamen Blühens auf die Senkung des Infektionsniveaus mit Flugbrand (*Ustilago avenae* (Pers.) Rostr.) bei Hafer (*Avena sativa* L.). Bachelorarbeit im Studium Agrarwissenschaften. Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Professur Pflanzenbau, Universität Rostock, 54 S.
- Tekle, S., Sissela Stråbø Schofer, Xinyao He , Yanhong Dong and Åsmund Bjørnstad. 2020: Variation in Anther Extrusion and Its Impact on Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Content in Oat (*Avena sativa* L.). Agronomy, 10, 354; doi:10.3390/agronomy10030354
- Tekle, S., Dill-Macky, R., Skinnies, H., Tronsmo, A.M. & Bjørnstad, A. (2012). Infection process of *Fusarium graminearum* in oats (*Avena sativa* L.). European Journal of Plant Pathology, 132, 431–442.
- Thiede, H. 1963: Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung von *Ustilago avenae* (Persoon) Jensen sowie der Infektionsmethodik. Phytopathol. Z. 48: 29–72.
- Vollmer, C. 2020: Untersuchung der Lodiculæ kleistogam und chasmogam blühender Hafersorten (*Avena sativa* L.) hinsichtlich morphologischer und physiologischer Unterschiede während des Blühvorgangs. Bachelorarbeit im Studium Agrarwissenschaften. Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Professur Pflanzenbau, Universität Rostock.
- Western, J.H. 1936: Biology of oat smuts. IV. The invasion of some susceptible and resistant oat varieties, including Markton, by selected biological species of smut. (*Ustilago avenae* (Pers.)) Jens and *Ustilago kolleri* (Wille). Ann. Appl. Biol. 23: 245–263.
- Wilcoxson, R.D. und Stuthman D.D. 1993: Evaluation of oats for resistance to loose smut. Plant Dis. 77: 818–821.
- Winkler, L.R., Bonman, M. J., Chao S., Yimer A.B., Bockelman H. and Klos E.K. 2016: Population Structure and Genotype-Phenotype Associations in a Collection of Oat Landraces and Historic Cultivars. Front. Plant Sci. 7:1077.doi: 10.3389/fpls.2016.01077.
- Zade, A. 1918: Der Hafer. Monographie: 355 S. Gustav Fischer, Jena.
- Zade, A. 1924: Neuere Untersuchungen über die Lebensweise und Bekämpfung des Haferflugbrandes (*Ustilago avenae* (Pers.) Jens.), Angew. Bot. 6: 113–125.

Zade, A. 1928: Masseninfektionen mit Haferflugbrand nach einem neuen Verfahren. Pflanzenbau 5, S. 43.

10. Übersicht zu Veröffentlichungen und Verbreitung der Ergebnisse

Autoren und Titel	Anlass, Zeitschrift
Sophie Brodführer, Matthias Herrmann, Ben Schmehe Kleistogamer Hafer zur nachhaltigen Vermeidung von Flugbrand (<i>Ustilago avenae</i> (Pers.) Jens.) <i>Cleistogamous flowering to prevent infection by loose smut (<i>Ustilago avenae</i> (Pers.) Jens.) in oat (<i>Avena sativa</i> L.).</i>	Vortrag Nr. 45-7 auf der 61. Deutschen Pflanzenschutztagung in Hohenheim, 11.-14.09.2018
Sophie Brodführer, Ben Schmehe and Matthias Herrmann Evaluation of the potential of cleistogamous flowering for a sustainable reduction of loose smut infection (<i>Ustilago avenae</i> (Pers.) Rostr.) in oats (<i>Avena sativa</i> L.)	11th Young Scientists Meeting 2018, Braunschweig, Germany, November 14-16
Sophie Brodführer, Matthias Herrmann, Ben Schmehe, Resistenz gegen Flugbrand in aktuellen Sorten des Saathaifers	Geplanter Beitrag für Ökologie & Landbau
Sophie Brodführer, Matthias Herrmann, Ben Schmehe, N. Tinker, B. Boyle, W. Bekele Genomic diversity within modern and historic oat lines out of Europe	Geplantas Manuskript für Crop Sci.
Sophie Brodführer, Matthias Herrmann, Ben Schmehe, N. Tinker, B. Boyle, W. Bekele Genome-Wide Association Mapping of Resistance to smut (<i>Ustilago avenae</i> (Pers.) Rostr.) in oats (<i>Avena sativa</i> L.)	Geplantas Manuskript für Crop Sci.
Sophie Brodführer, Matthias Herrmann, Ben Schmehe, N. Tinker, B. Boyle, W. Bekele Genome-Wide Association Mapping of flowering traits in oats	Geplantas Manuskript für Crop Sci.
Sophie Brodführer, Doreen Gabriel, Ben Schmehe, Matthias Herrmann Pedersen's pseudo-resistance against smut, an alternative strategy for oats?	Geplantas Manuskript für Seed Science and Technology